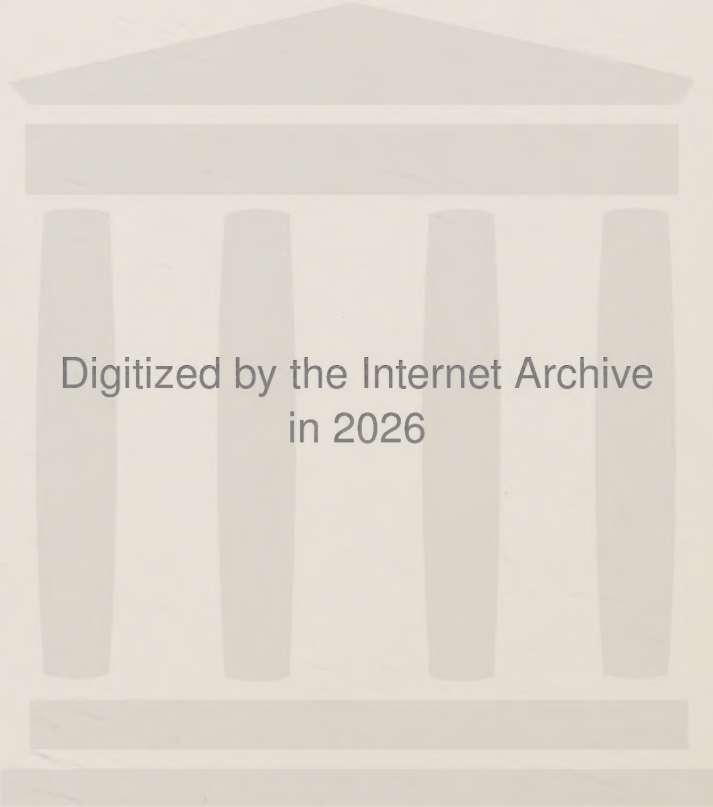


**UNTERSUCHUNGEN ZUR CHROMATINSTRUKTUR KOMPLEX
REGULIERTER GENE AM BEISPIEL DES
KANINCHEN - UTEROGLOBINGENS UND DES
HÜHNER - LYSOZYMGENS**

KLAUS JANTZEN

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554617_0045

**Untersuchungen zur Chromatinstruktur komplex regulierter Gene
am Beispiel des Kaninchen-Uteroglobins und des
Hühner-Lysozyngens**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Klaus Jantzen
aus Albstadt

München 1987

1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Bandlow
2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Wolf
Sondergutachter : Priv. Doz. Dr. T. Igo-Kemenes

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 1987

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit vom März 1984 bis März 1987 durchgeführt.

Herrn Priv. Doz. Dr. T. Igo-Kemenes danke ich herzlich für die Stellung des Themas, seine Unterstützung und stetiges Interesse während dieser Arbeit. Meinen Laborkollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit und ein stets angenehmes Arbeitsklima.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind teilweise veröffentlicht worden:

1. Jantzen, K., Fritton, H.P. und Igo-Kemenes, T. (1986)
Nucl. Acids Res. 14, 6085-6099
2. Jantzen, K., Fritton, H.P., Igo-Kemenes, T., Espel, E., Janich, S., Cato, A.C.B., Mugele, K. und Beato, M. (1987)
Nucl. Acids Res. 15, 4535-4552
3. Fritton, H.P., Jantzen, K., Igo-Kemenes, T., Nowock, J., Strech-Jurk, U., Theisen, M. und Sippel, A.E., in:
Architecture of Eukaryotic Genes (G. Kahl, ed.), im Druck

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
2.	Ergebnisse.....	7
2.1	Kartierung von DNAaseI-hypersensitiven Stellen im Uteroglobingenbereich des Kaninchens.....	7
2.1.1.	Charakterisierung repetitiver Elemente im Uteroglobin genbereich und Darstellung von Subklonen als Hybridisierungsproben für die indirekte Endmarkierung.....	7
2.1.2.	DNAaseI-hypersensitive Stellen in Leber, Lunge und Endometrium, in Abhängigkeit vom Hormonspiegel der Tiere.....	11
2.1.3.	Abwesenheit von hypersensitiven Stellen in der Lunge, trotz nachgewiesener Expression.....	15
2.1.4.	Feinkartierung der DNAaseI-hypersensitiven Stelle HS -0,1.....	17
2.1.5.	Feinkartierung der DNAaseI-hypersensitiven Stelle HS -2,4.....	19
2.1.6.	Ausprägung DNAaseI-hypersensitiver Stellen in der Chromatinstruktur unter Bedingungen der Hormoninduktion, Deinduktion und Reinduktion.....	23
2.2	Allgemeine DNAaseI-Sensitivität der Lysozymgen-Region im Ovidukt von Legehennen.....	26
2.2.1.	Einführung einer neuen Untersuchungsmethode zur Bestimmung der allgemeinen DNAaseI-Sensitivität von DNA-Regionen.....	27
2.2.2.	Grenzen der Chromatindomäne des Lysozymgens im Ovidukt von Legehennen.....	32
2.2.3.	Innerhalb der Grenzen der Lysozymdomäne wird im Ovidukt nur das Lysozymgen transkribiert.....	33
2.3.	Nukleotidsequenz des 3'-Endes der Chromatindomäne des Lysozymgens.....	35
2.3.1.	Sequenzierungsstrategie.....	35
2.3.2.	Nukleotidsequenz des 3'-Grenzbereichs der Domäne.....	36

2.4.	Untersuchungen zum Mechanismus der Entstehung von hypersensitiven Stellen in der Chromatinstruktur.....	42
2.4.1.	Verwendung des shuttle-Vektors CV 13 zur Transformation von Lysozymgenfragmenten in Hefe (<i>S. cerevisiae</i>).....	43
2.4.2.	Die 3'-Region des Lysozyms bleibt auch nach Transformation in Hefe in einer hypersensitiven Konformation.....	43
2.4.3.	Nukleotidsequenz im Bereich der hypersensitiven Stelle HS +3,9.....	50
3.	Diskussion.....	54
3.1.	Die DNAaseI-hypersensitiven Stellen des Uteroglobingens.....	54
3.1.1.	Aktiver und inaktiver Zustand des Kaninchenuterglobingens sind durch unterschiedliche Muster DNAaseI-hypersensitiver Stellen gekennzeichnet.....	54
3.1.2.	Das Muster von hypersensitiven Stellen bei einfach und komplex regulierten Genen.....	56
3.1.3.	Steroidhormon-abhängige hypersensitive Stellen in der Chromatinstruktur.....	57
3.1.4.	Die Progesteron-abhängige DNAaseI-hypersensitive Stelle HS -2,4 setzt sich aus ungewöhnlichen DNA-Sequenzelementen zusammen und enthält drei Progesteron-Rezeptor-Bindungsstellen.....	59
3.1.5.	Auch die hypersensitive Stelle HS -3,7 korreliert mit einer Hormon-Rezeptor-Bindungsstelle.....	62
3.1.6.	Vergleich des Uteroglobingens mit anderen Steroid-Hormon-kontrollierten Genen.....	63
3.2.	Die DNAaseI-sensitive Chromatindomäne des Lysozyngens.....	65
3.2.1.	Die Ausdehnung der DNAaseI-sensitiven Domäne.....	65
3.2.2.	Die Nukleotidsequenz an der 3'-Domänengrenze.....	67
3.2.3.	Zusammenhang zwischen DNAaseI-sensitiven Domänen und Domänen, die als Bereiche zwischen zwei Matrix-anheftungsstellen definiert sind.....	69
3.3.	Die hypersensitive Stelle HS +3,9 des Lysozyngens.....	69

4.	Matrialien und Methoden.....	72
4.1.	Matrialien.....	72
4.2.	Methoden.....	74
4.2.1.	Hormonbehandlung der Kaninchen.....	74
4.2.2.	Isolierung von Zellkernen.....	74
4.2.2.1.	Isolierung von Zellkernen aus Endometrium, Leber und Lunge von Kontrolltieren und hormonbehandelten Kaninchen, sowie aus Ovidukt, Leber und Erythro- zyten von Legehennen.....	74
4.2.2.2.	Isolierung von Hefezellkernen.....	75
4.2.3.	Verdauung von Zellkernen mit pankreatischer DNAaseI und Isolierung genomischer DNA.....	75
4.2.4.	Analyse von DNAaseI-hypersensitiven Stellen.....	76
4.2.5.	Analyse der Allgemeinen DNAaseI-Sensitivität.....	76
4.2.6.	Isolierung von mRNA aus Hühnerovidukt.....	77
4.2.7.	5'-Endmarkierung von mRNA.....	77
4.2.8.	DNA-Sequenzierung.....	78
4.2.9.	Rekombinante-DNA-Techniken.....	78
5.	Zusammenfassung.....	79
6.	Literaturverzeichnis.....	84
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	95

Lebenslauf

1. Einleitung

Eines der wichtigen Ziele der molekularen Biologie ist die Aufklärung der Mechanismen der eukaryontischen Genregulation. Über die Mechanismen des einfachen An- und Abschaltens von Genen hinaus, worauf sich die Genregulation bei Prokaryonten im wesentlichen reduziert (1), kommen bei Eukaryonten übergeordnete Regulationsmechanismen hinzu. Diese bewirken, daß bestimmte Gene zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt in der Entwicklung des Organismus an- bzw. abgestellt werden und stellen sicher, daß gewebsspezifische Gene nur in den vorgesehenen Zelltypen exprimiert werden.

An solchen übergeordneten Prozessen der Entwicklungskontrolle und der Regulation der gewebsspezifischen Expression sind in vielen Fällen Steroidhormone beteiligt (2). Unter den zahlreichen Steroidhormon-regulierten Genen bieten das Uteroglobingen des Kaninchens und das Lysozymgen des Huhns besonders interessante Aspekte. Das Uteroglobingen wird in verschiedenen Organen exprimiert, vor allem im Endometrium und in der Lunge (3). Die Aktivierung des Uteroglobingens im Endometrium erfolgt durch Östrogene und Progesteron (4). Glucocorticoide wirken im Endometrium nicht auf das Uteroglobingen, obwohl entsprechende Rezeptoren in diesem Gewebe vorhanden sind. Die Expression des Uteroglobingens in der Lunge wird dagegen von Glucocorticoiden reguliert, obwohl es auch Progesteronrezeptoren in diesem Organ gibt (5).

In ähnlicher Weise unterliegt auch das Lysozymgen in verschiedenen Geweben des Huhns unterschiedlichen Regulationsmechanismen. Im Ovidukt steht es unter der Kontrolle von Steroidhormonen. Die ausgeprägteste Wirkung besitzt Progesteron. Östrogene, Androgene und Glucocorticoide beeinflussen es jedoch ebenfalls (6,7). In Makrophagen dagegen wird das Lysozymgen konstitutiv exprimiert und ist unabhängig von wechselnden Hormonspiegeln des Organismus (8).

Über die Funktion des Uteroglobins ist nur wenig bekannt. Das Uteroglobin ist ein progesteronbindendes Protein, welches bisher nur in der Säugetierordnung der Lagomorpha (Hasen) gefunden wurde. Es tritt vom 1. bis 12. Tag der Trächtigkeit bzw. im pseudoschwangeren Zustand nach Hormonapplikation auf und macht in diesem Zeitraum 50-60% des Gesamtproteins im Uterussekret aus (9). Für das Endometrium wird ein Blastozystenschutz vor dem mütterlichen Hormon- und Immunsystem postuliert (10,84). Über die Funktion in der Lunge ist nichts bekannt.

Das Lysozym wird im differenzierten Hühnerovidukt gebildet und stellt neben Ovalbumin, Conalbumin und Ovomuroid eines der Haupt-eiweißproteine dar. Es wird aber auch in Makrophagen synthetisiert, die im Rahmen der Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen. In beiden Fällen besteht die Funktion des Lysozyms in seiner antibakteriellen Wirkung.

Die entwicklungs- und gewebsspezifische Regulation der Genexpression wird sicherlich von mehreren Faktoren gesteuert. Intensiv erforscht wurden in den letzten Jahren cis-wirkende DNA Elemente, die in Wechselwirkung mit transaktiven Proteinen, ihre Wirkung auf den Promotor und die Transkriptionsgeschwindigkeit ausüben (Enhancer, Silencer, andere transkriptionsaktivierende Faktoren etc.)(11,12,13,14,15,16). Änderungen der DNA-Struktur selbst (Übergang in linkshelikale Formen z.B. Z-DNA, partielle Einzelsträngigkeit, unter Torsionsspannung stehende DNA etc.) wurden ebenfalls als wichtige Elemente bei der Genregulation diskutiert (17,18,19). Auch das Muster der Methylierung von CpG-Dinukleotiden in und um das Gen scheint eine wichtige Rolle zu spielen (20,21). Nicht zuletzt ist die Art und Weise, wie Gene und ihre Kontrollelemente mit Histonen verpackt sind, d.h. die Chromatinstruktur, entscheidend für den Aktivitätszustand eines Gens (22).

Der inaktive Zustand eines Gens ist gekennzeichnet durch die Wicklung der DNA um Histonoktamere, wobei der Grundbaustein der Chromatinstruktur, das Nukleosom, gebildet wird (23). In fort-

laufender Wiederholung bildet die Nukleosomenkette das 10nm-Nukleofilament, welches die erste Ebene in einer Hierarchie von Superstrukturen darstellt. Dieses 10nm-Nukleofilament, welches im Elektronenmikroskop ein perlschnurartiges Aussehen zeigt, wird seinerseits unter Ausbildung einer 30nm-Fiber zu noch dichteren Strukturen (Solenoid, Superbeads) kondensiert (24,25). Die 30nm-Fiber ist sowohl in Interphasekernen, als auch in Metaphasechromosomen schleifenartig zu 30-150 Kb umfassenden Domänen gefaltet, die ihrerseits an tragenden Strukturen des Zellkerns, an die Kernmatrix, verankert sind (26). Diese Chromatindomänen können mit dem Elektronenmikroskop an histonbefreiten Chromosomen beobachtet werden (27).

Bei aktiven Genen ist die dichte Spiralisierung zur 30nm-Fiber (Solenoid, Superbeads) aufgelockert, so daß sie sich in einer Chromatinstruktur befinden, die allgemein sensitiver gegen DNAase I ist, als inaktives Chromatin (28). Diese erhöhte Nukleaseempfindlichkeit aktiver Gene wird als Allgemeine DNAaseI-Sensitivität bezeichnet. Eine weitere wichtige Eigenschaft der Chromatinstruktur im Bereich aktiver Gene besteht darin, daß die monotone Folge von Nukleosomen durch längere (100-400 Bp) nukleosomenfreie Regionen unterbrochen ist (29,30). Diese Regionen, sogenannte Nuklease-hypersensitive Stellen bestehen nicht aus "nackter" DNA, sondern sind mit Nichthistonproteinen assoziiert (22). Es gibt Hinweise dafür, daß solche Proteine regulatorische Eigenschaften besitzen (31,32). Die Ausdehnung der allgemeinen DNAaseI-Sensitivität im Bereich aktiver Gene gibt einen Hinweis auf die Länge jener Regionen, in denen sich die für ein Gen wichtigen regulatorischen Sequenzen befinden. Aus dem Muster der DNAaseI-hypersensitiven Stellen um ein Gen lassen sich Rückschlüsse auf Art, Kombination und Zahl von möglichen Faktoren ziehen, die in einem speziellen Gewebe die Genexpression beeinflussen.

Die Ziele dieser Arbeit bestanden darin, die Unterschiede in der Chromatinstruktur zu beschreiben, die in drei unterschiedlichen Aktivitätszuständen des Uteroglobins und des Lysozyms existieren.

stieren. Beim Uteroglobingen sollte der inaktive Zustand (repräsentiert durch Leberzellen) mit dem Progesteron-kontrollierten (Endometrium) und dem Glucocorticoid-kontrollierten aktiven Zustand (Lungenzellen) verglichen werden.

Während im Fall des Uteroglobingens der inaktive Zustand mit zwei verschiedenen hormonkontrollierten Zuständen des Gens verglichen werden sollte, interessierte im Fall des Lysozymgens der Unterschied zwischen dem hormonkontrollierten Zustand (Ovidukt) und dem der konstitutiven Expression (Makrophagen).

Zu Beginn dieser Dissertation war über die Chromatinstruktur des Uteroglobingens nichts bekannt. Das Gen wurde unabhängig von zwei Arbeitsgruppen kloniert und insgesamt ca. 12 Kb wurden näher charakterisiert (33,34). Das Gen selbst und 3 Kb 5'-flankierender DNA waren bereits sequenziert (34,35,36). Interessanterweise konnte die Sequenz TGTCT, die als Erkennungssequenz für Steroidhormonrezeptoren gilt, in der Promotorregion des Gens nicht entdeckt werden. Solche Sequenzen befanden sich jedoch 580, 825, 1050, 1255, 2630 und 2700 Bp oberhalb des Gens (37). Es war interessant herauszufinden, welche von diesen Sequenzen innerhalb von DNAaseI-hypersensitiven Regionen liegen und damit wahrscheinlich funktionell von Bedeutung sind. Zu Beginn dieser Arbeit war das Uteroglobingen das erste Beispiel für ein Gen, das durch Steroidhormone möglicherweise aus großer Entfernung reguliert wird (37). Dieses Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Beato durchgeführt. Nach Absprache sollten in vitro-Bindungsstudien mit gereinigtem Progesteronrezeptor und klonierter DNA in seinem Arbeitskreis durchgeführt werden, während meine Aufgabe auf die Aufklärung der Chromatinstruktur, insbesondere auf die Kartierung DNAaseI-hypersensitiver Stellen, zielte. Einer der interessantesten Befunde dieser Arbeit war, daß einige - jedoch nicht alle - Rezeptor-Erkennungssequenzen in der funktionell relevanten hypersensitiven Konformation vorliegen.

Im Falle des Lysozymgens wurden in unserer Arbeitsgruppe die DNAaseI-hypersensitiven Regionen in verschiedenen Geweben des Huhns, die den verschiedenen aktiven Zuständen entsprechen, bereits kartiert (38,39). Gewebsspezifische hypersensitive Stellen wurden selbst noch in einem Abstand von 8 Kb oberhalb und mehrere Kb unterhalb des Gens gefunden. Es war die Frage, ob diese Stellen alle in einer funktionellen Beziehung zum Lysozymgen oder zu einem anderen Gen stehen. Diese Frage kann beantwortet werden, wenn die Ausdehnung des Bereichs mit erhöhter allgemeiner DNAaseI-Sensitivität bestimmt wird. Der wichtigste Befund in diesem Zusammenhang war, daß alle hypersensitiven Stellen, bis auf eine, innerhalb der Domäne mit erhöhter allgemeiner DNAaseI-Sensitivität liegen. Offenbar dehnt sich der Bereich, in dem sich regulatorische Sequenzen des Lysozymgens befinden, über 24 Kb aus.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, Näheres über die Struktur und Funktion einzelner DNAaseI-hypersensitiver Stellen in Erfahrung zu bringen. Zur Funktion der meisten hypersensitiven Stellen des Lysozymgens liegen indirekte Hinweise vor (38,40,41), wobei es jedoch noch keine genauen Vorstellungen über die Funktion der beiden äußeren (HS -7,9, HS +7,9) und der am 3'-Ende des Gens gelegenen (HS +3,9) gibt.

Die DNA-Sequenzen in diesem Bereich sollten, sofern sie noch nicht bekannt waren, ermittelt werden, um mit Hilfe von Computer-Programmen überprüfen zu können, ob etwa Topoisomerase II-Bindungssequenzen in diesen Regionen vorkommen. Topoisomerase II wurde mit der Verankerung von Chromatindomänen mit der Kernmatrix in Verbindung gebracht (42,43).

Die hypersensitive Stelle HS +3,9 ist insofern von Interesse, da sie keinerlei Gewebsspezifität zeigt. Sie ist selbst in den völlig abgeschalteten Erythrozyten als einzige hypersensitive Stelle im Lysozymgenbereich vorhanden (44). Durch Sequenzanalyse dieser Region sollte geklärt werden, ob Nukleotidsequenzen vorkommen, die eine Wicklung der DNA um Histonoktamere verhindern (z.B. PolyG-Sequenzen), und daher die Hypersensitivität bewirken. Eine

alternative Denkmöglichkeit ist, daß ein oder mehrere Proteinfaktoren in allen Hühnerzellen vorkommen und durch ihre Bindung Hypersensitivität induzieren. Diese Möglichkeit sollte durch Transformation geeigneter Plasmide in Hefezellen und Untersuchung der Chromatinstruktur beantwortet werden.

2. Ergebnisse

2.1. Kartierung von DNAaseI-hypersensitiven Stellen im Uteroglobingenbereich des Kaninchens

In den letzten Jahren ist bekannt geworden, daß Hormon-Rezeptor-Bindungsstellen gewebsspezifische Enhancer-Sequenzen sind. Die Hormonrezeptoren stellen die zugehörigen transaktiven Faktoren dar (45). Es war interessant zu ermitteln, wo im Uteroglobingenbereich die Steroid-Rezeptor-Bindungsstellen sind und ob sie im aktiven Zustand des Gens in einer hypersensitiven Chromatinstruktur vorliegen. Da Enhancer auch sehr weit vom Gen entfernt liegen können, war zu erwarten, daß hypersensitive Stellen ebenfalls in großem Abstand vom Gen zu finden sind.

Das Kaninchen-Uteroglobingen wurde bereits vor dieser Dissertation von der Arbeitsgruppe Beato kloniert und große Bereiche waren sequenziert (34). Abb.1 zeigt den Uteroglobingenbereich mit seiner Exon-Intron-Struktur. Wie aus dem Maßstab ersichtlich (A in Abb.1), ist insgesamt eine Strecke von 12 Kb um das Gen charakterisiert worden. Meine Aufgabe bestand darin, die Chromatinstruktur dieser Region zu untersuchen, insbesondere die Lage hypersensitiver Stellen zu kartieren.

2.1.1. Charakterisierung repetitiver Elemente im Uteroglobingenbereich und Darstellung von Subklonen als Hybridisierungsproben für die indirekte Endmarkierung

Die Karte der für die Chromatinstruktur-Untersuchungen wichtigen Restriktionsnuklease-Spaltstellen ist in D der Abb.1 dargestellt. Die Kenntnis der Lage repetitiver Sequenzen ist wichtig, da sie bei der Methode der indirekten Endmarkierung stören. Die unter C mit schwarzen Balken gekennzeichneten repetitiven Elemente waren bereits bekannt (34). Die mit schraffierten Balken dargestellten

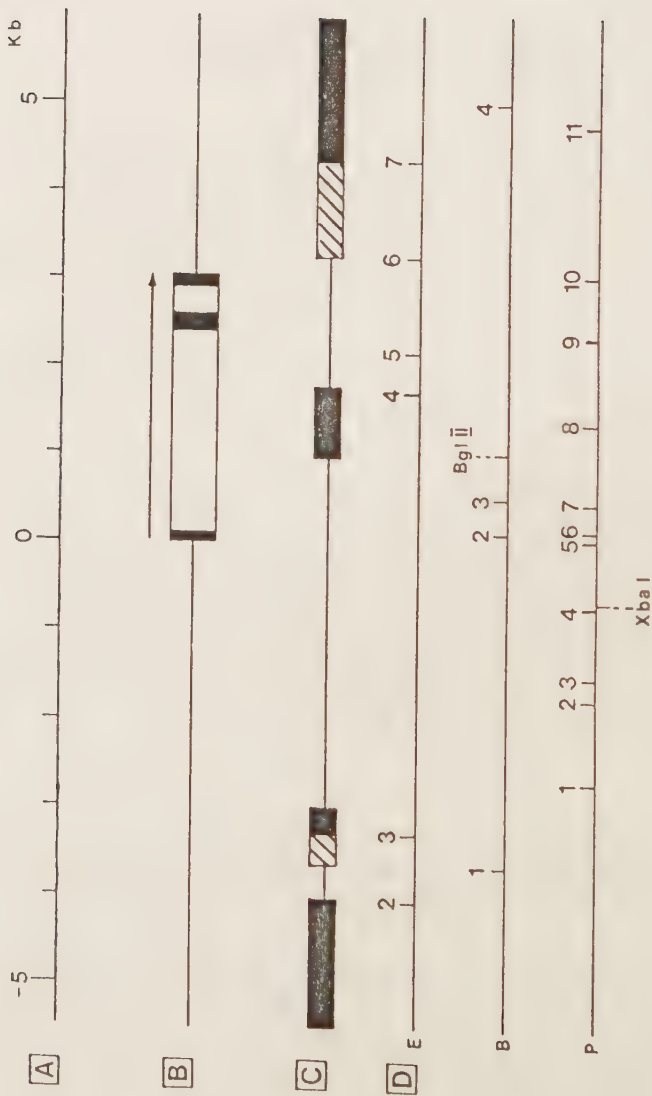


Abbildung 1: Restriktionskarte und Lage von repetitiven Sequenzen in der Uteroglobingen-region

A: Maßstab in Kb, ausgehend vom Transkriptionsstart des Gens
 B: Exon (schwarz) - Intron (weiß) - Struktur und Transkriptionsrichtung (Pfeil) des Gens
 C: Lage von repetitiven Elementen (schwarze und schraffierte Boxen; die schraffierten Anteile ergänzen die aus früheren Arbeiten bekannten repetitiven Sequenzen
 D: Restriktionskarte; E: EcoRI, B: BamHI, P: PstI

Elemente wurden im Rahmen dieser Arbeit ermittelt. Hybridisierungen mit solchen Proben markierten ein Kontinuum genomischer Banden, statt ein definiertes Signal zu liefern.

Die Chromatinstruktur aller bisher untersuchten aktiven Gene ist durch das Auftreten DNAaseI-hypersensitiver Stellen gekennzeichnet (22,46). Die Kartierung der hypersensitiven Stellen erfolgte nach der Methode von Wu (47), die als indirekte Endmarkierung bekannt ist. Das Prinzip dieser Methode soll an dieser Stelle kurz erläutert werden. Kerne werden mit steigenden Mengen DNAaseI behandelt. Die DNA aus diesen Kernen wird isoliert und mit einem Restriktionsenzym nachgespalten. Die entstehenden DNA-Fragmente werden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosefilter übertragen. Restriktionsfragmente und Subbanden, die durch DNAaseI-Spaltung an hypersensitiven Stellen entstanden sind, werden durch Hybridisierung mit einem kurzen, radioaktiv markierten DNA-Fragment (Probe), im Autoradiogramm sichtbar gemacht. Geeignete Proben sind kurz, und liegen sehr nahe an einem der beiden Enden des Restriktionsfragmentes (s. Zeichnung von Abb.2). Auf Grund von Doppelstrangbrüchen durch die DNAaseI, treten außer dem ursprünglichen Restriktionsfragment Subbanden auf, deren Länge den Abstand der hypersensitiven Stelle(n) relativ zu der endständigen Restriktionsspaltstelle unmittelbar angibt.

In Tabelle 1 sind die für Chromatinanalysen des Uteroglobingenbereichs eingesetzten Klone und deren Herkunft angeführt. Die Klone EB 0,35 und EE 1,1 (schraffiert gekennzeichnete Elemente in Abb.1C) erwiesen sich als hoch repetitiv, und konnten bei weiteren Experimenten nicht eingesetzt werden.

A	B	C	D	E
PP 0,8	P4-P5	pBR322	-	F
PP 0,75	P3-P4	pUC7	-	B
BB 0,4	B2-B3	pBR322	+	F
EB 0,35	B1-E3	pBR322	-	J
PP 0,95	P1-P2	pUC7	-	B
BBgl 1,0	B3-Bgl	pBR322	-	F
BE 0,4	E2-B1	pBR322	-	F
EE 1,1	E6-E7	pBR322	+	B
PP 0,3	P5-P6	pBR322	-	J
PB 0,3P	P4-B2	pBR322	-	F

Tabelle 1: Auflistung der Uteroglobingenklone, die bei Hybridisierungsexperimenten eingesetzt wurden

Spalte A: Bezeichnung der Klone. Die beiden Buchstaben geben die randständigen Restriktionsspaltstellen der inserierten DNA in 5'-3'-Richtung an, die nachfolgende Zahl gibt die Länge der inserierten DNA in Kb an.

Spalte B: Durchnumerierte randständige Restriktionsspaltstellen (vgl. Abb.1)

Spalte C: Vektor

Spalte D: Das Vorhandensein repetitiver Elemente auf der inserierten DNA ist durch ein + gekennzeichnet.

Spalte E: Herkunft des Klons: B: Beato, M., Marburg; F: Fritton, H.P., München; J: diese Arbeit.

2.1.2. DNAase I-hypersensitive Stellen in Leber, Lunge und Endometrium, in Abhängigkeit vom Hormonspiegel der Tiere

Drei Organe bzw. Gewebe des Kaninchens wurden auf das Vorhandensein hypersensitiver Stellen in der Chromatinstruktur untersucht. Das Endometrium repräsentiert ein Gewebe, in dem das Gen zur Zeit der Trächtigkeit unter Östrogen- und Progesteronkontrolle exprimiert wird. In der Lunge dagegen ist das Uteroglobingen unter Glucocorticoidkontrolle. Die Expression zeigt einen, im Vergleich zum Endometrium, völlig unterschiedlichen zeitlichen Verlauf. Außerdem ist die Menge an produzierter mRNA in der Lunge geringer als im Endometrium (5). Die Leber schließlich stellt ein Zielorgan für Östrogene und Glucocorticoide dar, in dem das Uteroglobingen jedoch nicht exprimiert wird. Die Strategie zur Kartierung hypersensitiver Stellen ist der Zeichnung von Abb.2 zu entnehmen. Zunächst wurde die Region zwischen den beiden EcoRI-Stellen untersucht (Abb.2A). Im Endometrium von Östrogen- und Progesteron-behandelten Tieren sind deutlich zwei hypersensitive Stellen sichtbar: HS -0,1 und HS -2,4 (Die Bezeichnung der hypersensitiven Stellen gibt jeweils den Abstand vom Transkriptionsstart in Kb an, ein negatives Vorzeichen bedeutet 5', ein positives 3' von der Transkriptionsstartstelle).

In Spalte a ist DNA aus Kernen aufgetragen, die ohne DNAaseI inkubiert wurden. Nur das Restriktionsfragment E3-E4 (s. Abb.1) gibt ein Signal; es treten keine Subbanden auf. In den folgenden Spalten b-f wurden steigende Mengen DNAaseI eingesetzt. Es sind zwei Subbanden zu beobachten (HS -2,4 und HS -0,1) deren Intensität zunächst zu- und dann wieder abnimmt. Spalte g zeigt eine Bahn aus dem Verlauf des Verdaus von Kernen, wobei die Tiere mit Östrogen, aber ohne Progesteron, stimuliert waren. (In Abb.4 ist der gesamte Verlauf eines derartigen Verdaus abgebildet). Die Stimulation mit Östrogen alleine, die im Endometrium nur eine geringe Transkription induziert, bewirkt ein schwaches Auftreten der hypersensitiven Stelle im Promotorbereich (HS -0,1), während HS -2,4 nicht zu beobachten ist.

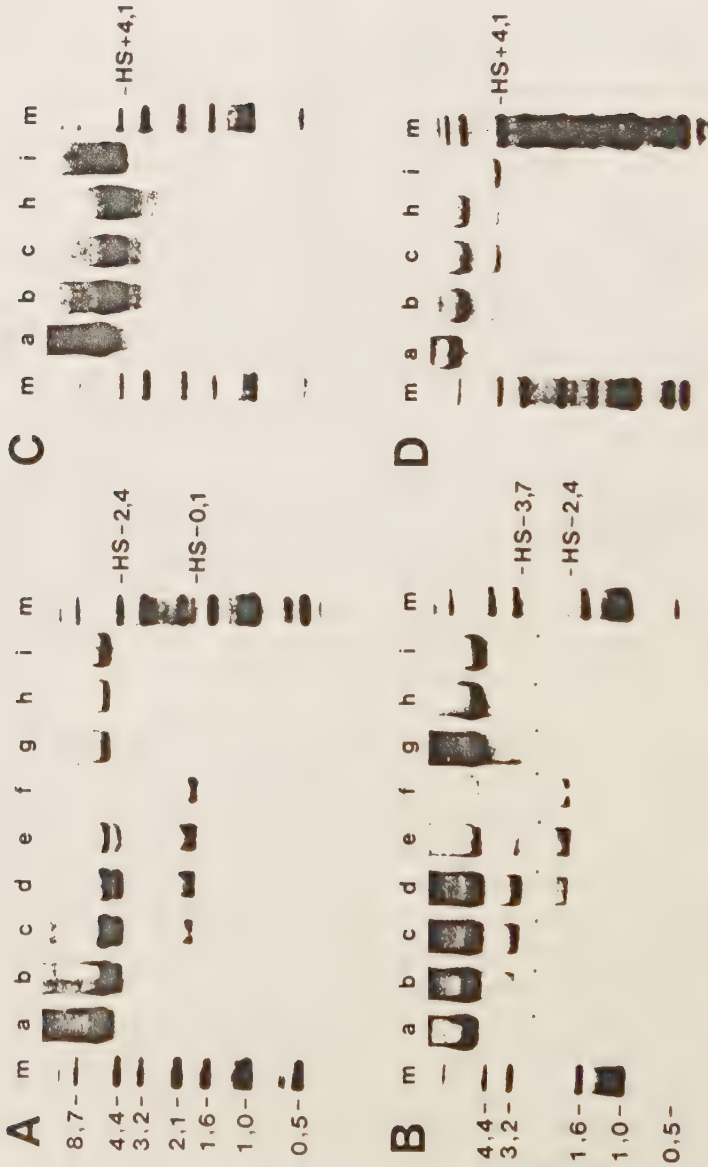


Abbildung 2

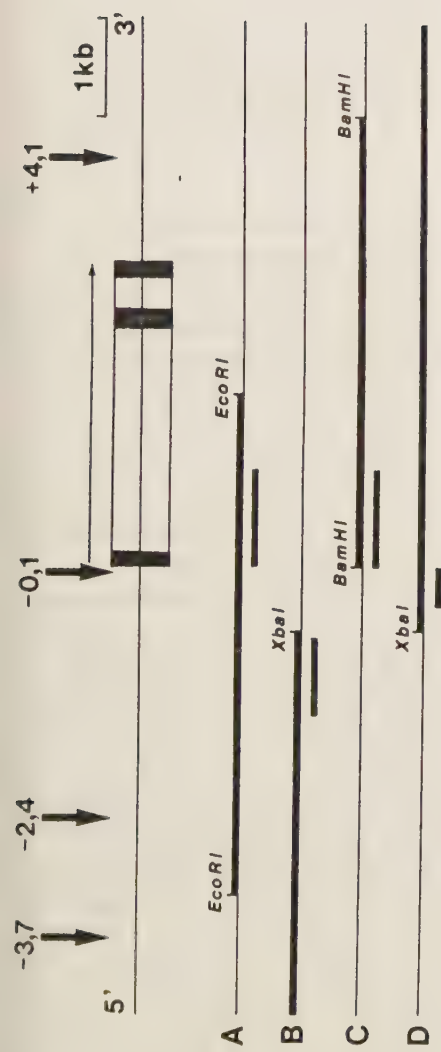


Abbildung 2: Kartierung von DNAaseI-hypersensitiven Stellen im Uteroglobingenbereich

Die wichtigen Regionen sind durch dicke Linien gekennzeichnet und die verwendeten Hybridisierungsproben sind durch Balken unterhalb jeder Linie angegeben. Die EcoRI-Spaltstellen entsprechen E3 und E4, die BamHI-Spaltstellen entsprechen B3 und B4 in Abb.1.

A-D der Zeichnung entsprechen den Teilabbildungen A-D. Das Gen ist als Box gezeichnet, Exons schwarz, Introns weiß. Der horizontale Pfeil gibt die Transkriptionsrichtung an. Verschiedene Gewebe des Kaninchens wurden untersucht: a-f, Endometrium von Östrogen- und Progesteron-stimulierten Tieren; g, nur Östrogenbehandlung; h, Lunge von Dexamethason-behandelten Tieren; i, Leber von Östrogen- und Progesteron-behandelten Tieren. Für die Experimente mit Östrogen- und Progesteron-stimuliertem Endometrium ist der gesamte Verlauf des DNAaseI-Verlaufs gezeigt:

a: ohne DNAaseI, b: 16 U DNAaseI; c-f: von Bahn zu Bahn wird die DNAaseI-Konzentration verdoppelt.

Vertikale Pfeile zeigen die Position der DNAaseI-hypersensitiven Stellen (HS), vor (-0,1 Kb, -2,4 Kb und -3,7 Kb) und hinter (+4,1 Kb) der Transkriptionsstartstelle. Fragmente, die in Teilabb.8 durch Punkte gekennzeichnet sind, zeigen vermutlich Kreuzhybridisierungen der Probe. Marker (m) stellen Mischungen von Restriktionsfragmenten dar, die sich vom Plasmid pBR322 ableiten; ihre Länge ist jeweils in Kb angegeben.

In Spalte h ist die DNA aus Lungengewebe von Dexamethason-behandelten Tieren aufgetragen (Dexamethason ist ein synthetisches Glucocorticoid). Auch hier sind keine Subbanden zu erkennen, die auf hypersensitive Stellen schließen lassen. Spalte i zeigt eine Bahn des DNAaseI-Verdaus von Leberkernen aus Östrogen- und Progesteron-behandelten Tieren. In diesem Östrogenzielorgan treten nach Induktion keine hypersensitiven Stellen auf. Dieses Ergebnis steht im Einklang damit, daß das Gen in diesem Gewebe inaktiv ist.

Die beiden hypersensitiven Stellen HS -0,1 und HS -2,4 sind gewebsspezifisch und treten nur im Endometrium von Östrogen- und Progesteron-behandelten Tieren auf. Abb.2B zeigt, daß 5' von der XbaI-Stelle im Endometrium der Tiere eine weitere hypersensitive Stelle auftritt: HS -3,7. Die Bahnen a-f stellen den Verlauf eines DNAaseI-Verdaus dar. Das Verhalten der Subbanden entspricht demjenigen von Abb.2A. Subbanden die ohne Maximum schon im Nullwert auftreten sind durch einen Stern gekennzeichnet und deuten auf nicht identifizierte Restriktionsfragmente, die mit der Uteroglobprobe schwach kreuzhybridisieren. Aus den Spalten g-i ist ersichtlich, daß auch HS -3,7, wie die beiden anderen, gewebsspezifisch ist. Es zeigt sich, daß HS -3,7 im Endometrium von nur mit Östrogen behandelten Tieren, analog zu HS -0,1, schwach auftritt (Bahn g). HS -3,7 ist weder in der Leber von Östrogen- und Progesteron-behandelten (Bahn h), noch in der Lunge von Dexamethason-induzierten Tieren zu erkennen (Bahn i).

Zusammengefaßt ergibt sich das Bild, daß sich alle drei Stellen durch eine Gewebsspezifität auszeichnen, indem sie nur im Endometrium von Tieren gefunden werden, die mit Östrogen und Progesteron behandelt wurden. Östrogenbehandlung alleine bewirkt nur ein schwaches Auftreten von HS -0,1 und HS -3,7 (Abb.2 und 4), während HS -2,4 die Anwesenheit von Progesteron unbedingt erfordert.

In der Leber treten in entsprechenden Positionen keine hypersensitiven Stellen auf, weder in nicht stimulierten, noch in Glucocorticoid-, oder Östrogen- und Progesteron-behandelten Tieren. Neben den gewebsspezifischen hypersensitiven Stellen vor dem Gen trat hinter dem Gen eine hypersensitive Stelle auf, HS +4,1, die keine Gewebsspezifität zeigte, und völlig unabhängig von der Hormonbehandlung war (Abb.2C und D). Gewebsspezifische hypersensitive Stellen 3' vom Gen sind auch in anderen Fällen beobachtet worden (38,48,49).

2.1.3. Abwesenheit von hypersensitiven Stellen in der Lunge, trotz nachgewiesener Expression

In der Lunge wurden überraschenderweise vor dem Gen ebenfalls keine hypersensitiven Stellen gefunden, obwohl in diesem Organ Uteroglobulin unter der Kontrolle von Glucocorticoiden exprimiert wird. In Abb.3 ist der Verlauf eines DNAaseI-Verdaus von Lungenkernen aus Cortisolacetat-induzierten Tieren dargestellt. Es treten keine Subbanden auf, die der Anwesenheit hypersensitiver Stellen entsprechen würden. Weder die Behandlung mit Dexamethason (Abb.2A, h), noch mit Cortisolacetat (Abb.3) zeigte also eine Veränderung auf Chromatinebene. Unbehandelte Tiere, als auch Tiere, die mit Östrogen und Progesteron behandelt wurden, zeigten in der Lunge keine DNAaseI-hypersensitiven Stellen in der Chromatinstruktur. Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses negative Ergebnis besteht darin, daß nur eine minore Population der Lungengewebszellen das Uteroglobulin exprimieren. Nur wenn ein erheblicher Anteil der Zellen in der aktiven Chromatinkonformation vorliegt, reicht die Sensitivität der Analyse aus, um hypersensitive Stellen im Chromatin nachzuweisen (s. Diskussion).

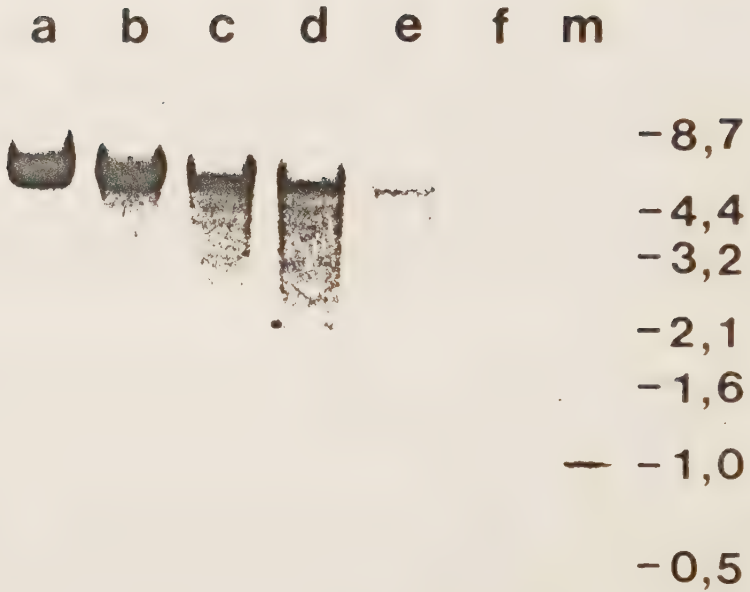


Abbildung 3

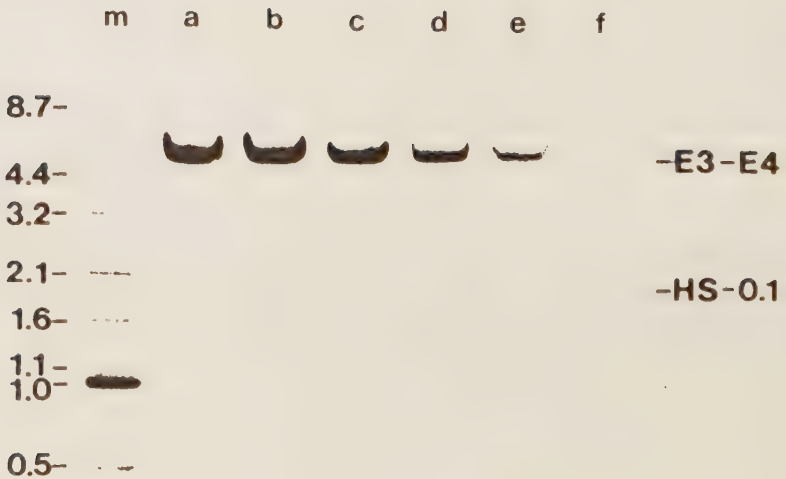


Abbildung 4

Abbildung 3: Abwesenheit von DNAaseI-hypersensitiven Stellen in der Chromatinstruktur des Uteroglobingens und seiner 5'-flankierenden Region im Lungengewebe von Cortisolacetat-stimulierten Tieren.

Dargestellt ist der Verlauf des DNAaseI-Verdaus; Spalte a: Inkubation ohne DNAaseI, Spalte b: Inkubation mit 32 U Enzym, in Spalte c bis f wird in aufeinanderfolgenden Bahnen die DNAaseI-Konzentration jeweils verdoppelt. Der Längenstandard ist der gleiche wie in Abb.2. Die Hybridisierungsprobe und die untersuchte Genregion sind in Teil A der Zeichnung von Abb.2 angegeben.

Abbildung 4: Kartierung von DNAaseI-hypersensitiven Stellen im Endometrium von ausschließlich mit Östrogen behandelten Tieren.

Marker, DNA-Menge und eingesetzte DNAaseI-Konzentration in den einzelnen Spalten, Hybridisierungsprobe und die untersuchte Genregion entsprechen den Angaben in Abb.3.

2.1.4. Feinkartierung der hypersensitiven Stelle HS -0,1

Die Kontrolle der Expression eukaryontischer Gene resultiert aus dem Wechselspiel von Elementen, die die präzise Stelle der Transkriptionsinitiation und die Häufigkeit der Initiationsereignisse diktieren. Die Promotorsequenzen sind zusammengesetzt aus konservierten Elementen in der Nähe der Startstelle, die die Spezifität der Initiation bestimmen (TATA-Box, CAAT-Box) und nicht konservierten Upstream-Elementen, die die Frequenz der Transkriptionsinitiation diktieren (50).

Um zu ermitteln, welche Elemente in der hypersensitiven Region liegen, wurden höher auflösende Gele verwendet. Nach der Grobkartierung muß HS -0,1 auf dem Fragment P4-P5 lokalisiert sein (Abb.2). Daher wurde die DNA aus DNAaseI-verdauten Kernen mit PstI nachgespalten und die aufgetrennten Restriktionsfragmente wurden mit dem radioaktiv markierten Fragment P4-P5 hybridisiert (Abb.1). Unter dem Restriktionsfragment P4-P5 tritt eine erwartete Subbande auf, die durch die hypersensitive Stelle bedingt

ist (Abb.6). Sie liegt 540-610 Bp 3' von P4, d.h. von Position -50 bis -130 vor der Transkriptionsstartstelle. Aus der Breite der Bande kann geschlossen werden, daß die hypersensitive Region die CAAT-Box und eine Goldberg-Hogness-Box ähnliche Sequenz (-98 bis -91) einschließt, jedoch weder die hauptsächliche Transkriptionsstartstelle, noch die zugehörige Goldberg-Hogness-Box (-33 bis -24) umfaßt (35).

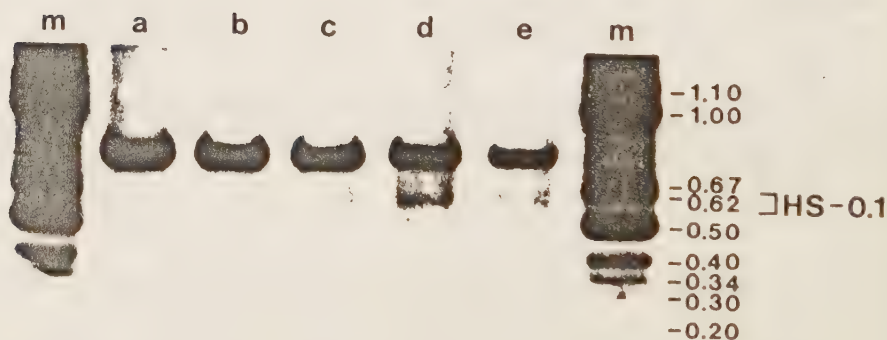


Abbildung 5: Höher auflösendes Gel zur Feinkartierung von HS -0,1

Dargestellt ist der Verlauf eines DNAaseI-Verdaus. Die einzelnen Kinetik-Werte (a-e; DNAaseI-Konzentrationen siehe Abb.3) wurden mit PstI nachgespalten. Als Hybridisierungsprobe diente ein chimares pBR-Plasmid, welches das Fragment P4-P5 (785 Bp) enthält (siehe Abb.1). Die Subbande entspricht der hypersensitiven Stelle HS -0,1 die auf dem Fragment P4-P5 lokalisiert ist, und deren Lage durch die Klammer angegeben wird.

2.1.5. Feinkartierung der hypersensitiven Stelle HS -2,4

In früheren Arbeiten wurde die Lage der Glucocorticoidrezeptor-Bindungsstelle 2,6 bis 2,7 Kb vor dem Gen bestimmt (37). Aus der Tatsache, daß in den bisher untersuchten Fällen die Glucocorticoid- und die Progesteronrezeptor-Bindungsstelle zumindest teilweise überlappen (37,51), erwarteten wir die progesteronabhängige hypersensitive Stelle in diesem Bereich. Unsere Kartierungen haben dagegen die hypersensitive Stelle auf 2,4 Kb vor dem Gen festgelegt. Um sicher zu gehen, daß die bisher bestimmte Hormonrezeptor-Bindungsstelle außerhalb der hypersensitiven Region liegt, wurden Feinkartierungen unternommen. Wegen der potentiellen Bedeutung dieses Befundes wurden zwei unabhängige Methoden eingesetzt, die in Abb.6A und B dargestellt sind.

Die erste Art der Feinkartierung nützt aus, daß an Hand unserer bisherigen Kartierungen eine RsaI-Stelle in der hypersensitiven Region liegen sollte. Trifft diese Annahme zu, so erwartet man, daß Subbanden durch RsaI-Spaltung einerseits und DNAaseI-Spaltung andererseits, in ähnlicher Position auf dem Gel erscheinen. DNAaseI-verdaute Kerne wurden mit PstI nachgespalten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsfragmente und Transfer auf Nitrozellulosefilter, wurde mit dem radioaktiv markierten 970-Bp-PstI-Fragment hybridisiert. Nach der Autoradiographie konnten unter dem erwarteten PstI-Fragment 3 Subbanden beobachtet werden, die der nun höher aufgelösten hypersensitiven Stelle HS -2,4 entsprechen. Auf Bahn d wurde PstI und RsaI doppelverdaute DNA aufgetragen. Das Experiment zeigt, daß die RsaI-Spaltstelle innerhalb des DNAaseI-hypersensitiven Bereichs von HS -2,4 liegt. Durch Sequenzdaten ist die Position der RsaI-Stelle genau bekannt (-2380 Bp). Die drei Hauptstellen der DNAaseI-Spaltung kartieren bei -80, -15 und +85 von der RsaI-Stelle.

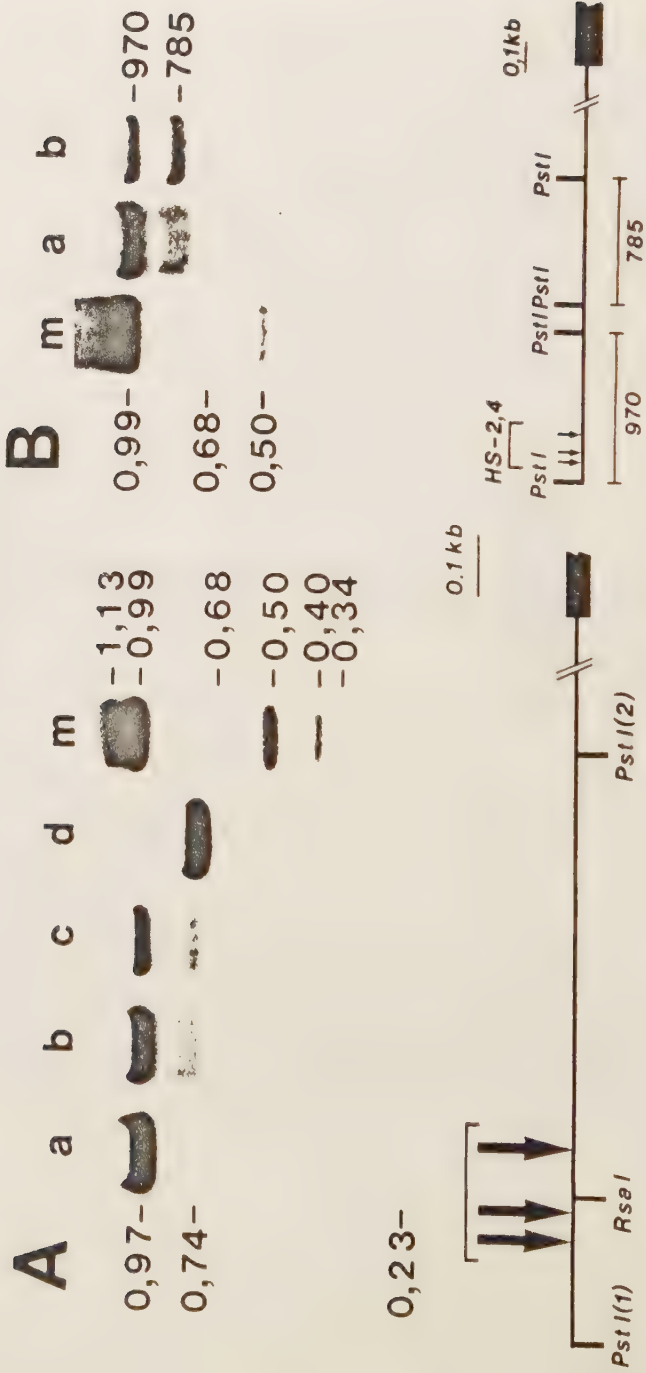


Abbildung 6

Abbildung 6:

A: Feinkartierung der hypersensitiven Stelle HS -2,4

Endometriumkerne von Östrogen- und Progesteron-stimulierten Kaninchen wurden a) ohne, b) mit 250 U, c) mit 500 U DNAaseI inkubiert. Die gereinigte DNA wurde mit PstI nachgespalten. d) Kaninchen-DNA wurde mit PstI und RsaI verdaut. Die Längenstandards (m) stellen vom pBR 322 abgeleitete Fragmente dar; rechts sind die Längen in Kb angegeben. Die Elektrophorese erfolgte in 1,2%-Agarosegelen und der Southernblot wurde mit einem chimären pBR-Plasmid hybridisiert, welches das Fragment P1-P2 (970 Bp) enthält. Links sind die Längen des PstI-Fragmentes und abgeleiteter Fragmente nach RsaI-Spaltung angegeben. Das Uteroglobingen ist als Box dargestellt. Präferentielle DNAaseI- Schnittstellen sind durch vertikale Pfeile gekennzeichnet. Die Ausdehnung der hypersensitiven Stelle HS -2,4 ist durch die Klammer angegeben.

B: Feinkartierung der hypersensitiven Stelle HS -2,4

DNA von DNAaseI-verdauten und hormonstimulierten Endometriumkernen wurde mit PstI gespalten und auf einem 1,2%-Agarosegel aufgetrennt. Der Southernblot wurde mit dem 970-Bp-PstI-Fragment hybridisiert (a) und zeigt das Restriktionsfragment und DNAaseI abgeleitete Subfragmente (Pfeile). Nach Abwaschen der Radioaktivität wurde der gleiche Filter mit einer Mischung eines 970 Bp und eines 785 Bp Fragmentes hybridisiert. Auf Grund der kürzeren Expositionszeit sind nur die Markerbanden sichtbar. Die DNAaseI-abgeleiteten Fragmente bleiben unsichtbar. Die externen Marker sind die gleichen wie in Abb.2, die Längen sind in Kb angegeben.

Die zweite Methode der Feinkartierung ist in Abb.6B dargestellt. Sie ist etwas weniger anschaulich, dafür aber noch genauer als die erste. Mit PstI nachgespaltene DNA aus DNAaseI-verdauten Kernen wurde mit der 970-Bp-Probe hybridisiert. Das entsprechende Restriktionsfragment und die 3 Subbanden, die der DNAaseI-Spaltung entsprechen, treten deutlich auf. Die Radioaktivität wurde dann abgewaschen und der Filter ein zweites Mal gleichzeitig mit zwei Proben hybridisiert, deren Länge aus der DNA-Sequenz exakt bekannt war (970 Bp und 785 Bp). Bei der zweiten Hybridisierung wurden die Filter kürzer exponiert damit nur die Markerbanden sichtbar werden (Spalte b). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß Marker und Probe in der gleichen Bahn laufen und diese interne Standardisierung schließt die Möglichkeit von Laufartefakten aus. Beide Methoden der Feinkartierung lieferten völlig übereinstimmende Ergebnisse. Die bis dato bekannten Glucocorticoid-Rezeptor-Bindungsstellen zwischen 2,6 und 2,7 Kb vor dem Gen, liegen eindeutig ausserhalb der hypersensitiven Stelle HS - 2,4. Kürzlich durchgeführte DNAaseI-Footprinting-Experimente zeigten jedoch drei weitere Progesteron-Rezeptor-Bindungsstellen innerhalb von HS -2,4.

2.1.6. Ausprägung DNAaseI-hypersensitiver Stellen in der Chromatinstruktur unter Bedingungen der Hormoninduktion, Deinduktion und Reinduktion

Vor steroidkontrollierten Genen wurden, in unterschiedlichen Abständen zum Gen, hypersensitive Stellen beobachtet, deren Zugänglichkeit für DNAaseI vom Hormonspiegel des Organismus abhängt. Solche Stellen erscheinen nach der Hormonbehandlung (Induktion), verschwinden nach Hormonentzug (Deinduktion) und treten nach erneuter Hormongabe (Reinduktion) unmittelbar wieder auf. Hypersensitive Stellen, die ein derartiges hormonabhängiges Verhalten zeigen, findet man in diversen Abständen vor verschiedenen Genen, so z.B. im LTR (Long terminal repeat) von stabil integrierten MMT-Viren (Mouse mammary tumor-Viren) (52), 2,0 Kb vor dem Tyrosin-Aminotransferase-Gen der Ratte (53), innerhalb von 0,3 Kb vor dem Hühner-apoVLDL-II-Gen (54), 0,7 Kb vor dem Hühner-Vitellongenigen (48) und 1,9 Kb vor dem Hühner-Lysozym-Gen (39). Um das Verhalten der hypersensitiven Stellen des Uteroglobins zu untersuchen, wurden Kerne aus dem Endometrium von Tieren nach entsprechender Hormonbehandlung analysiert. Das Ergebnis zeigt die Abb.5. Die Banden, welche die drei 5'-hypersensitiven Stellen im Endometrium repräsentieren, nehmen mit der Dauer des Hormonentzugs an Intensität ab und treten nach einer zweiten Applikation der Steroide wieder auf. Im Falle des Uteroglobins sind somit alle hypersensitiven Stellen vor dem Gen von einer Veränderung des Hormonspiegels betroffen. HS -2,4 scheint jedoch vom Hormonentzug am stärksten betroffen zu sein (siehe Bahn h,i). Die Intensität der hypersensitiven Stellen bei den verschiedenen Hormonbedingungen korreliert exakt mit der jeweiligen Menge an gebildetem Transkript (55).



Abbildung 7

Abbildung 7: Kartierung von DNAaseI-hypersensitiven Chromatinstellen im Endometrium von hormonaktivierten, hormonentzogenen und reinduzierten Kaninchen.

Die Tiere wurden mit einer einzelnen Dosis Östrogen und Progesteron behandelt und 24 h (a-c), 65 h (d-f) oder 1 Woche (g-i) später getötet. Reinduzierte Tiere erhielten zunächst eine Dosis Östrogen und Progesteron und eine zweite Dosis nach 4 Wochen Hormonentzug. Die Tiere wurden 24 h nach der zweiten Hormoninjektion getötet. Die untersuchten Bereiche des Uteroglobingens in den Teilabbildungen A und B entsprechen den Linien A und B der Zeichnung von Abb.2. Die mit einem Punkt gekennzeichneten Fragmente in B entsprechen kreuzhybridisierender DNA (siehe Legende von Abb.2). Die mit einem Stern gekennzeichnete Bande stellt eine weitere hypersensitive Stelle dar oder ist eine Kontamination.

2.2. Allgemeine DNAaseI-Sensitivität der Lysozymgenregion im Ovidukt von Legehennen

Alle bisher untersuchten Gene liegen im aktiven Zustand in einer sensitiven Chromatinkonformation vor, die sich über einige Kb oberhalb und unterhalb des Gens erstreckt (56-68). Diese als allgemeine Sensitivität bekannte Eigenschaft ist nicht zu verwechseln mit hypersensitiven Stellen, die 50-400 Bp lange, lokale, nukleosomenfreie Diskontinuitäten in der Chromatinstruktur darstellen. Die Ursache der erhöhten allgemeinen Sensitivität gegenüber DNAaseI ist nicht bekannt. Sie beruht vermutlich auf einer aufgelockerten Überstruktur des Chromatins oder auf einer veränderten Struktur der Nukleosomen (22).

Für die Analyse der allgemeinen Sensitivität werden verschiedene Methoden eingesetzt.

Bei einer der Methoden werden durch eine cot-Analyse die relativen Mengen von DNAaseI-sensitiven und -resistenten Fragmenten bestimmt. Eine DNA-Probe, die zu sensitiven Bereichen homolog ist, hybridisiert bei höheren cot-Werten als DNA-Proben die zu resistenten Bereichen homolog sind. Mit dieser Methode wurden unter anderem die DNAaseI-sensitiven Domänen des Ovalbumingens und des GAPDH-Gens bestimmt (60,68).

Bei einer weiteren Methode werden Zellkerne mit steigenden Mengen DNAaseI verdaut. Die allgemeine DNAaseI-Sensitivität wird bestimmt, indem man verfolgt wie schnell das Hybridisierungssignal eines bestimmten Restriktionsfragmentes, im Vergleich zu einem etwa gleich großen, nicht sensitiven Restriktionsfragment, verschwindet. Mit dieser Methode der Blothybridisierung wird die Wahrscheinlichkeit für den ersten Doppelstrangbruch gemessen. Da im Bereich aktiv transkribierter Gene hypersensitive Stellen auftreten, kann sich für entsprechende Fragmente die Wahrscheinlichkeit für einen Doppelstrangbruch erhöhen; diese Restriktionsfragmente erscheinen auf Grund der auf ihnen befindlichen hypersensitiven Stellen sensitiv obwohl sie nicht notwendigerweise in einer sensitiven Konformation vorliegen (57,58,61,62,63,64,65,69,

70,71,72,73). Die mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse unterscheiden nicht streng zwischen allgemeiner Sensitivität und hypersensitiven Stellen.

2.2.1. Einführung einer neuen Untersuchungsmethode zur Bestimmung der allgemeinen DNAaseI-Sensitivität von DNA-Regionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere Methode entwickelt. Zellkerne werden mit steigenden Mengen DNAaseI verdaut. Gleiche Mengen der verschieden stark verdauten DNA werden auf Nitrozellulosefilter aufgetragen und mit Hybridisierungsproben aus dem sensitiven bzw. resistenten Genbereich hybridisiert. Bei gleichen DNAaseI-Konzentrationen ergeben resistente Sequenzen ein stärkeres Hybridisierungssignal, weil sensitive Sequenzen schneller abgebaut und auf dem Nitrozellulosefilter nicht mehr zurückgehalten werden. Die Vorteile dieser Methode liegen in ihrer einfachen Durchführung und ihrer Schnelligkeit. Ferner werden mehrere unabhängig stark verdaute Ansätze gleichzeitig untersucht, im Gegensatz zur zuerst beschriebenen Methode (Flüssigkeitshybridisierung, cot-Analyse), wo nur ein einziger Partialverdau analysiert wird.

Im folgenden Abschnitt wurde die Zuverlässigkeit der Methode nachgewiesen. Kerne aus dem Hühnerovidukt, Leber und Erythrozyten wurden mit zunehmenden Mengen DNAaseI verdaut. Äquivalente Mengen unverdauter und verdauter DNA, mit mittleren DNA-Längen zwischen 5000 Bp und 300 Bp, wurden auf Nitrozellulosefiltern fixiert und die relativen Konzentrationen verschiedener Nukleotidsequenzen durch die Slot-Blot-Hybridisierung untersucht. Als quantitatives Maß für die DNAaseI-Sensitivität diente die DNAaseI-Konzentration die notwendig war, um 50% des fraglichen Chromatinfragments zu nicht hybridisierungsfähigen Größen abzubauen. Abb.8A zeigt, daß in Oviduktkernen doppelt soviel DNAaseI notwendig ist um 50% der DNA abzubauen, die mit den Proben A und J hybridisiert, wie für die zu Probe E komplementäre DNA. Dies bedeutet, daß die DNA innerhalb des Strukturgens (Probe E) die doppelte Sensitivität

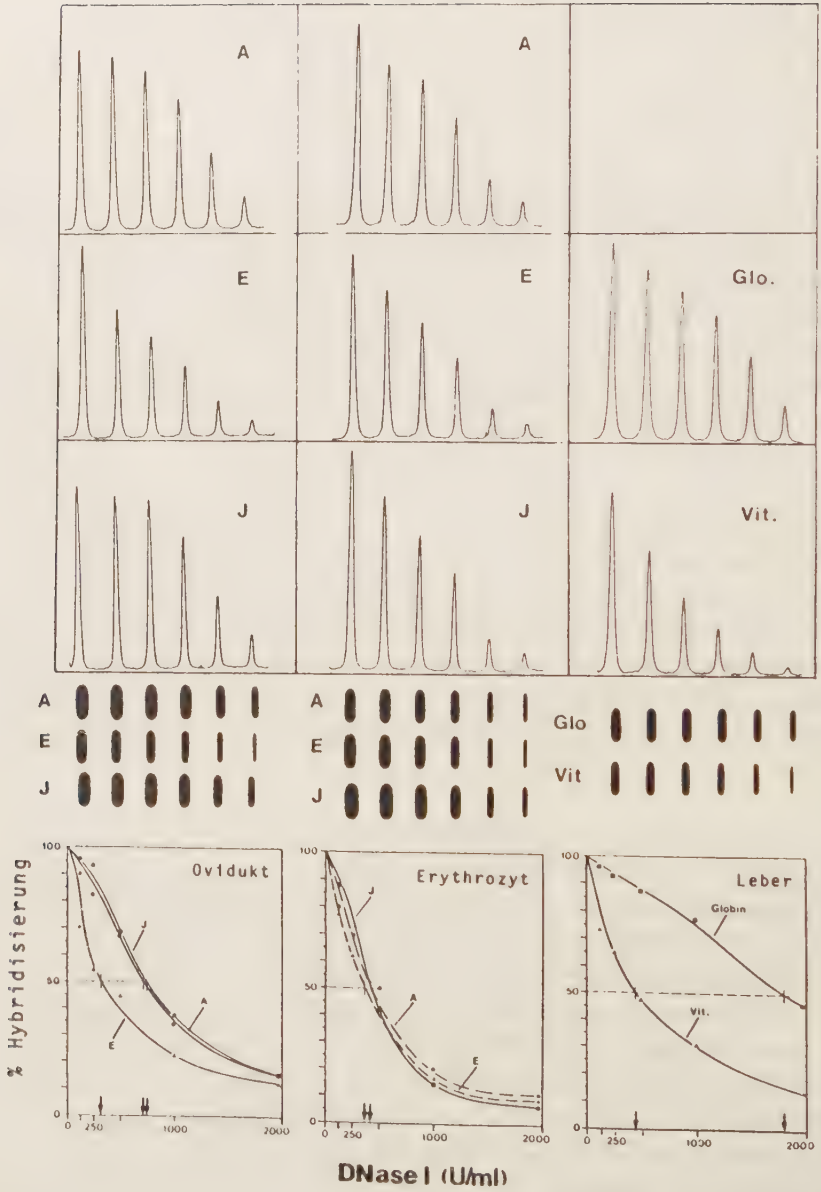


Abbildung 8

Abbildung 8: Ausgewählte Sequenzen in und um das Lysozymgen, als auch von anderen Referenzgenen wurden auf ihre Sensitivität gegenüber DNAaseI-Verdau untersucht.

A: 5 µg DNA aus Oviduktkernen, die mit zunehmenden Mengen DNAaseI verdaut (0, 125, 250, 500, 1000, 2000 U/ml) und dann auf Nitro-cellulosefilter aufgetragen wurden. Die Filter wurden zuerst mit der ^{32}P -markierten Probe A hybridisiert und zur Autoradiographie exponiert. Nach Entfernung der Radioaktivität wurde der gleiche Filter mit der Probe E hybridisiert. Ein anderer Filter der auf exakt gleiche Weise hergestellt wurde diente der Hybridisierung mit der Probe J.

B: Die gleichen drei Regionen des Lysozymgens wurden auf ihre DNAaseI-Sensitivität in Erythrozytenkernen untersucht. Der gleiche Filter wurde für nachfolgende Hybridisierungen mit allen drei Proben verwendet.

C: Die DNAaseI-Sensitivität des β -Globin- und Vitllogeningens wurde in Leberzellkernen gemessen. Über Länge und Lage der Hybridisierungsproben gibt die Abb.10 Auskunft.

Im oberen Teil der Abb. sind "Scans" von Autoradiogrammen dargestellt, die nur ein Drittel solange exponiert wurden als die im mittleren Teil abgebildeten. Die Fläche unter den Peaks wurde bestimmt und als Funktion der DNAaseI-Konzentration dargestellt (unterer Teil). Die DNAaseI-Konzentration die notwendig ist, um 50% des zu untersuchenden Fragmentes zu einer nicht hybridisierungsfähigen Größe abzubauen wurde durch Interpolation bestimmt und ist jeweils als vertikaler Pfeil angegeben.

aufweist, gegenüber der DNA, die von der Probe A und J erkannt wird und etwa 20 Kb vor bzw. hinter der Transkriptionsstartstelle liegt. Bei Verwendung der gleichen drei Proben kann in Erythrozyten, die das Lysozymgen nicht exprimieren, kein Unterschied in der Sensitivität beobachtet werden (Abb.8B). Diese Ergebnisse bestätigen, daß sich das Lysozymgen, in dem Gewebe in dem es exprimiert wird, in einer sensitiven Domäne befindet. Als weitere Kontrolle wurde die Sensitivität des Vitellogeningens mit der des β -Globingens in der Leber verglichen. Das in der Leber aktive Vitellogeningen zeigt eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber DNAaseI als das inaktive β -Globingen (Abb.8C).

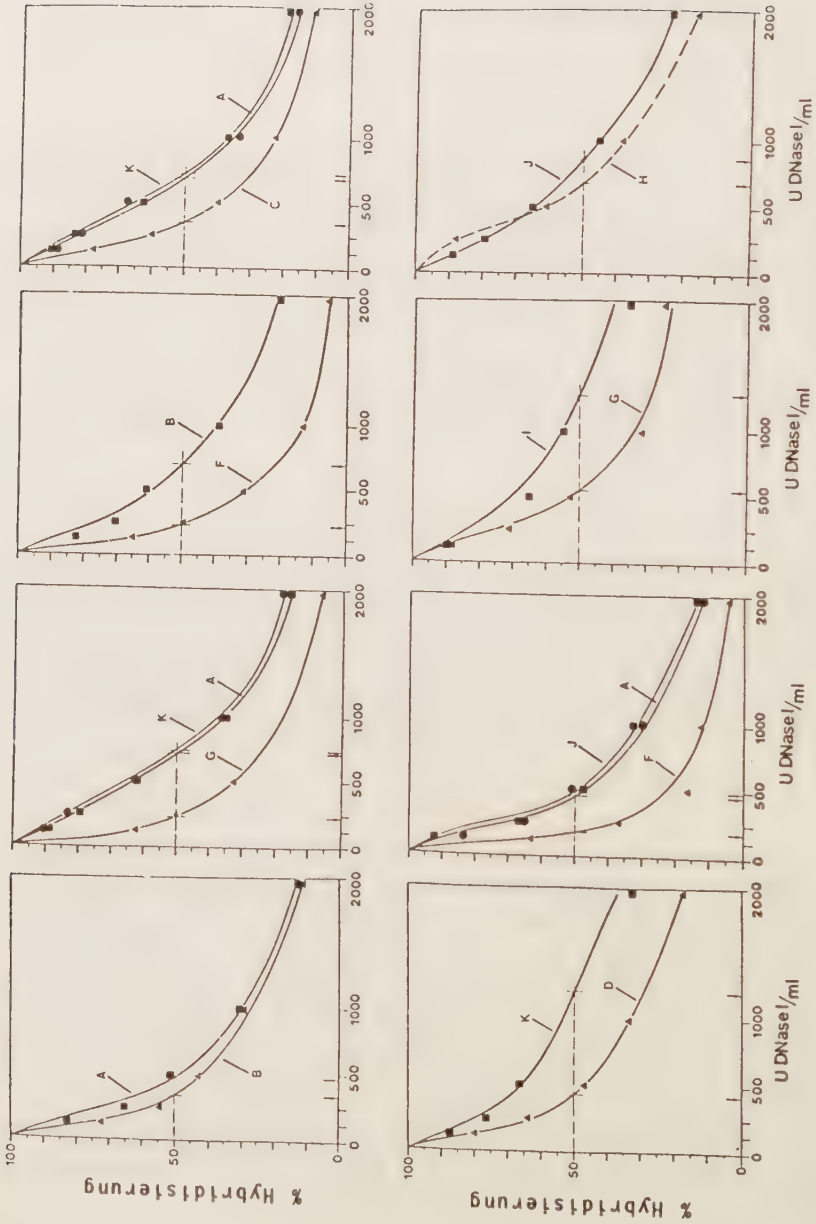


Abbildung 9

Abbildung 9: DNAaseI-Sensitivität ausgewählter Sequenzen in und um das Lysozymgen in Oviduktkernen.

5 µg DNA aus Oviduktkernen wurde mit zunehmenden Mengen DNAaseI (0, 125, 500, 1000, 2000 U/ml) verdaut und auf 8 getrennte Nitrozellulosestreifen aufgetragen. Jeder Filter wurde nacheinander mit 2 oder 3 Proben hybridisiert (Großbuchstaben). Die Länge und Lage der Hybridisierungsproben im Verhältnis zum Lysozymgen ist in Abb.10 gezeigt. Die Autoradiogramme wurden densitometriert und die Flächen unter den Peaks wurden als Funktion der DNAaseI-Konzentration abgebildet. Die DNAaseI-Konzentration die notwendig ist, um 50% des Fragmentes zu verdauen, ist jeweils durch einen vertikalen Pfeil dargestellt, und wurde eingesetzt, um die relative Sensitivität verschiedener Regionen um das Lysozymgen zu schätzen. Die Ergebnisse sind in Abb.10 zusammengefaßt.

2.2.2. Grenzen der Chromatindomäne des Lysozymgens im Ovidukt von Legehennen

Um die Ausdehnung der gesamten sensitiven Domäne zu bestimmen, wurde eine Anzahl von geeigneten Subklonen eingesetzt (A-K, Abb.9), die einen DNA-Bereich von 50 Kb um das Gen abdecken. In Abb.9 wurde jeweils die Sensitivität von einem DNA-Fragment aus dem transkribierten bzw. diesem eng benachbarten Bereich, mit der Sensitivität eines Fragmentes weit ober- und unterhalb des Gens verglichen. Das erste Feld von Abb.9 zeigt, daß die DNA-Sequenzen, die der Probe B entsprechen nur wenig sensitiver sind, als die Sequenzen, die der Probe A entsprechen. Andererseits ist die C-Region doppelt so sensitiv wie die A-Region. Gemäß dieser Ergebnisse muß die 5'-Grenze zwischen A und C liegen. Auf der 3'-Seite zeigen die DNA-Sequenzen die von der Probe G erkannt werden, verglichen mit der J- oder K-Region, eine hohe Sensitivität, während die DNA die der Probe H entspricht in ihrer Sensitivität dazwischenliegt. Die 3'-Grenze der Domäne muß also nahe der H-Region liegen.

Das Lysozymgen liegt im Oviduktgewebe innerhalb einer etwa 24 Kb langen Domäne mit erhöhter Sensitivität gegenüber DNAaseI. Die 5'-Grenze dieser Domäne ist ziemlich breit und umfaßt eine Region von 6-7 Kb Länge, entlang derer die Sensitivität langsam abnimmt. Die 3'-Grenze auf der anderen Seite scheint definierter zu sein. Die Fragmentkombinationen in den verschiedenen Teilen der Abb.9 wurden so ausgewählt, daß je ein Fragment aus der sensitiven Region, das andere bzw. die beiden anderen Fragmente, aus der resistenten Region stammten. Aus Gründen der Genauigkeit wurde derselbe Filter nacheinander mit zwei oder drei Proben hybridisiert, die direkt verglichen werden sollten. Die Zusammenfassung der Ergebnisse in Abb.10, umfaßt mehrere Reihen von unabhängigen Experimenten, von denen eines in der Abb.9 dargestellt ist.

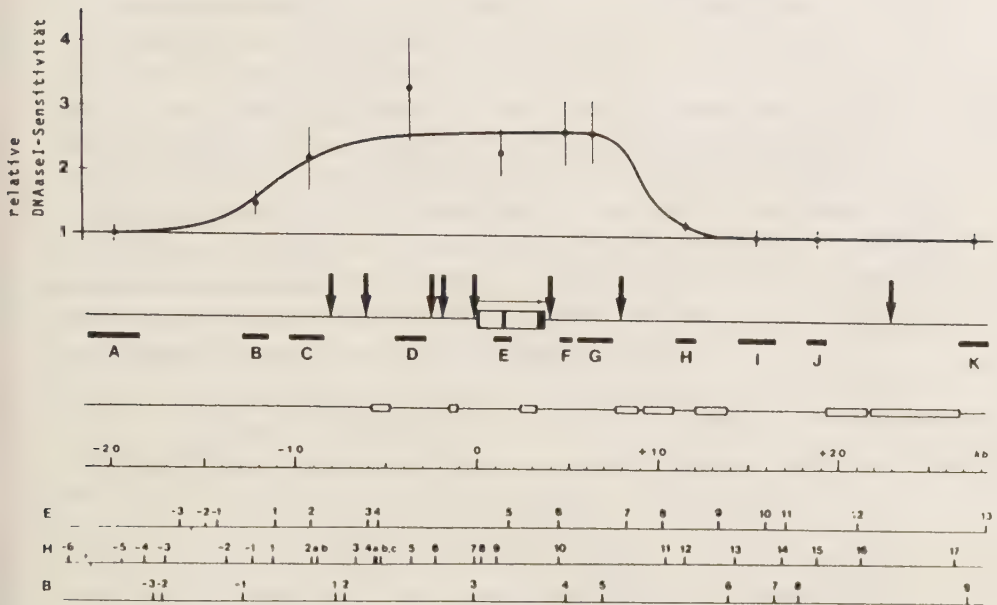


Abbildung 10: Die DNAaseI-sensitive Domäne des Lysozymgens

Die DNAaseI-sensitive Domäne des Lysozymgens wurde aus den Ergebnissen der Abb.8 und 9 sowie zusätzlicher derartiger Experimente (nicht gezeigt) bestimmt. Mittelwerte (●) und Standardabweichungen (vertikale Balken) sind angegeben. Das Gen ist als Box gezeichnet, Exons schwarz und Introns weiß. Der horizontale Pfeil zeigt Transkriptionsstart und -richtung. Vertikale Pfeile markieren die Position von DNAaseI-hypersensitiven Stellen, die schon in früheren Arbeiten kartiert wurden. Länge und Position der Hybridisierungsproben sind als schwarze Balken dargestellt, die mit Großbuchstaben bezeichnet sind. Die offenen Boxen in der dritten Linie zeigen die Position repetitiver Sequenzen. Im unteren Teil der Abb. sind ein Maßstab in Kb und Karten von Restriktionsspaltstellen (E=EcoRI, H=HindIII, B=BamHI) angegeben.

2.2.3. Innerhalb der Grenzen der Lysozymdomäne wird im Ovidukt nur das Lysozymgen transkribiert

Um sicherzustellen, daß in der analysierten Lysozymgen-Domäne von 24 Kb nur ein Strukturgen liegt, wurde untersucht, ob im Hühnerovidukt andere Transkripte aus diesem Bereich nachgewiesen werden

können. Das Ergebnis zeigt die Abb.11. ^{32}P -5'-endmarkierte Poly(A)-enthaltende RNA hybridisiert nur mit Plasmid-DNA, die Sequenzen des Lysozymgens enthält (Proben d, E und f). Die Ergebnisse zeigen, daß in dieser Region auch keine Transkripte repetitiver DNA auftreten. Da die Anreicherung von Poly(A⁺)-RNA über eine Poly(U)-Säule nicht vollständig war, würde man Hybridisierungssignale von Transkripten ohne Poly(A)-Ende auch sehen, sofern sie vorhanden wären. Anscheinend spielen Polymerase III-Transkripte repetitiver DNA aus der Lysozymgenregion keine wichtige Rolle bei der in vivo-Kontrolle der Lysozymgenexpression in Oviduktzellen, wie dies von anderen Autoren vermutet wurde (74, 75).

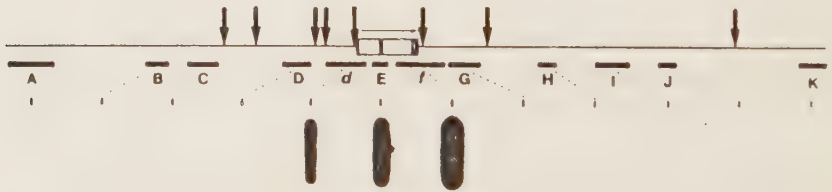


Abbildung 11: In Oviduktzellen wird innerhalb der sensitiven Domäne und ihrer angrenzenden Sequenzen (-22 Kb bis +28 Kb) ausschließlich das Lysozymgen transkribiert.

5µg Plasmid-DNA mit Hühnersequenzen gemäß den angegebenen schwarzen Balken, wurden auf Nitrozellulosestreifen fixiert und mit ^{32}P -markierter, Poly(A)-enthaltender mRNA aus dem Hühnerovidukt hybridisiert. Die DNA-Klone entsprechen denjenigen, die für die Bestimmung der Grenzen der Domäne verwendet wurden und sind mit Großbuchstaben bezeichnet. Die abnehmende Intensität des Hybridisierungssignals vom 3'- zum 5'-Ende beruht auf partiellem Abbau der isolierten RNA vor der Isolierung der mRNA durch eine Poly(U)-Säule und der damit verbundenen Anreicherung von 3'-Sequenzen.

2.3. Nukleotidsequenz des 3'-Endes der Chromatindomäne des Lysozyngens

Das Ovalbumingen des Huhns liegt im Hühnerovidukt zusammen mit seinem verwandten Genen X und Y in einer 100 Kb umfassenden DNAaseI-sensitiven Chromatindomäne. Sowohl die 5'- als auch die 3'-Grenze der Domäne ist durch das Auftreten von Vertretern einer Gruppe von mittelrepetitiven Sequenzen, der sogenannten CRI-Familie gekennzeichnet. Ihnen wurde eine wichtige Rolle bei der Etablierung der Domäne bzw. der Anheftung von Chromatin-Schleifen an die Kernmatrix zugewiesen (74,76).

Untersuchungen von Laemmli et al. an verschiedenen Drosophila-Genbereichen konnten spezifische Matrix- bzw. Scaffold-Anheftungsregionen (MAR's bzw SAR's) charakterisieren. Diese sogenannten MAR's bzw. SAR's weisen spezifische Sequenzmerkmale auf. Es handelt sich um AT-reiche Regionen (A- und T- Cluster) in denen sich die Drosophila-Topoisomerase II-Bindungskonsensussequenz häuft (42,43,77). Hochrepetitive Sequenzen, vergleichbar mit der CRI-Familie, haben Laemmli und Mitarbeiter nicht gefunden.

Um zu analysieren, ob eine der oben beschriebenen Sequenzmotive an der 3'-Grenze der Lysozyngendomäne auftreten, wurden über zwei Kb dieses Bereichs, der weitgehend aus repetitiven Fragmenten besteht, sequenziert.

2.3.1. Sequenzierungsstrategie

Abb.12 zeigt die Sequenzierungsstrategie bei der Ermittlung der Sequenz der 3'-Grenze der Domäne. Die Fragmente B5-E7 und X4-E8 tragen repetitive Sequenzen. Es wurden entweder geeignete Subklone der zu untersuchenden Region isoliert, oder entsprechende "Primer" synthetisiert, um längere Subklone von verschiedenen Stellen aus zu sequenzieren. Die Bezeichnung der Restriktions-spaltstellen entspricht der in Abb.10 angegebenen.

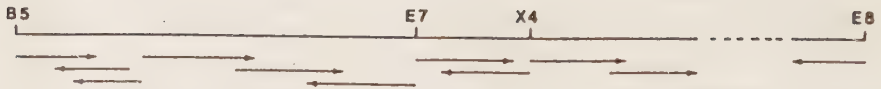


Abbildung 12: Strategie zur Bestimmung der Sequenz am 3'-Ende der sensitiven Lysozymendomäne.

Die Bezeichnung der angegebenen Restriktionsspaltstellen entspricht derjenigen in Abb.10. Der gestrichelte Bereich entspricht einer Lücke von ungefähr 800 Bp.

2.3.2. Nukleotidsequenz des 3'-Grenzbereichs der Domäne

In Abb.13 ist die ermittelte Sequenz dargestellt. Der gestrichelte Bereich, der nicht sequenziert wurde, entspricht einer Länge von etwa 800 Bp.

Von Position 8096 bis 8136 konnte die hoch konservierte Konsensussequenz eines CRI-Elementes lokalisiert werden (eingerahmt). Dieses CRI-Element fällt entweder mit der hypersensitiven Stelle HS +7,9 zusammen, oder ist ihr zumindest sehr eng benachbart. CRI-Elemente besitzen eine hoch konservierte Region von 40 Bp Länge, aber außer diesem Bereich sind die Sequenzen bei den einzelnen Mitgliedern der Familie recht divergent und ihre Grenzen können nicht genau festgelegt werden. Ähnlich wie beim Ovalbumin ist an der 3'-Grenze der Lysozymendomäne ebenfalls ein CRI-Element vorhanden. Dieses Element ist in Transkriptionsrichtung und somit entgegengesetzt zu dem entsprechenden Element an der 3'-Grenze der Ovalbumingendomäne orientiert.

B5 * * * * *
GGATCCTTGTAAACAAAGTTAATCGTCTTTTAAGGTTTGGTTTATTCAATTAATTTGCTT 7759
* * * * *
TTAAGCTGTAGCTGAAAAAGAACGTGCTGGTCTTCCATGCACAGGTGGAGCTCTGTGCAA 7819
* * * * *
AGTCTCTCTGGTCTCACCAGCCTTTTAATTGCCGGGATTCTGGCACTGTTCTGAGAGGGC 7879
* * * * *
TCAGACTGGCTTCGTTTGTGTTGAACAGCGTGTACTGCTTTCTGTAGACATGGCCGGTTTC 7939
* * * * *
TCTCCTGCAGCTTATGAACTGTTCACACTGAACACACTGAACAGTTGCCAAGAGCCTGA 7999
* * * * *
TGCCATCCTGAGCATCAAGGCAGCTGATGTGCTCTGGGCAGCCTGGTCTGGTGGTTGGCG 8059
* * * * *
ATCCTGCACATAGCAGCGGGGTTGAAACTCGATGATCACTGTCGGTCTTTTCAACCCAG 8119
* * * * *
GCTATTCTATGATTCTATGATTCAACAGCAAAATCATATGTAAGAGAGGAGAAACAAACA 8179
* * * * *
CAAGTCGCTACTGTTTGCAATTTTGTTCATTTGGTAAAGAGTCAGGTTTTAAATTCAG 8239
* * * * *
AATCTGTCTGGTTTTGGTGTTTTTTTTTTTTTTTTATTATTATTTCTTTGGGGTTCTTTTG 8299
* * * * *
ATGCTTTATCTTTCTCTGCCAGGACTGTGTGACAATGGGAACGAAAAGAACATGCCAGG 8359
* * * * *
CACTGTCTCGATTGCACACGCTGGTTGCACTCAGTAGCAGGCTCAGAACTGCCAGTCTT 8419
* * * * *
TCCACAGTATTACTTTCTAAACCTAATTTTAATAGCGTTAGTAGACTTCCATCACTGGGC 8479
* * * * *
AGTGCTTAGTGAATGCTCTGTGTGAACGTTTTACTTATAAGCATGTTGGAAGTTTGATG 8539
* * * * *
TTCCTGGATGCAGTAGGGAAGGACAGATTAGCTATGTGAAAAGTAGATTCTGAGTATCGG 8599
* * * * *
GGTTACAAAAGTATAGAAACGATGAGAAATCTGTGTAACTAATTGGAAATTTCTTTAAGCG 8659
* * * * *
TTCACCTATGCTACATTCATAGTATTTCATTAAAGTAGGAAAAGGTAAACGTGAAG 8719
* * * * *
TCGTGTGATTTTCGGATGGAAACCCGCCCTTCCTATGCACCTGACCAACTTCAGAGGAAA 8779
* * * * *
AGCCTATTGAAAGCCGAGATTAAAGCCACCAAAAGAACTCATTTGCATTGGAATATGTAGT 8839
* * * * *
ATTTGCCCTCTTCTCCGGGTAATTACTATACCTTATAGGGTGCTTATATGTTAAATGAG 8899
* * * * *
TGGCTGGCACTTTTTATTCTCACAGCTGTGGGAATTCCTCTAGGAACACAATTTTAATCT 8959
E7 * * * * *

```

      *      *      *      *      *
GTTCCACTGGTGACTGCTTTGTGCAGCACTTCCACCTGAAGAGATCAATACACTCTTCAAT 9019

      *      *      *      *      *
GTCTAGTTCTGCAACACTTCCGGCAACCTCACATCTTATTTTCACTACTCTCTTCATCGCCT 9079

      *      *      *      *      *
ATGCTTATTAAACGAATAATCTGGTAATTTTGTTTTAAATGACTGTCCTGACCCCGATG 9139

      *      *      *      *      *
ATGACCGTGTCACCTAAAGCTCAATTCAGGTCTGAATCTCTTCAACTCTCTGTAGCT 9199

      *      *      *      *      *
AACATGAAGAATCTTCAAAGTTAGGTCTAGGGCTTAAAGGGCTAACTGTAGATGTTATT 9259.

      *      *      *      *      *
BCCTGGTTTCTGTGCTGAAGGCTGTAGTATTAGAGCGTTCAACCTCTAGACTAGAGAAG 9319
                                     X4
      *      *      *      *      *
AGTTTCCTGAGGAAGACTCAATCTTCATTTTCATGTTTTGTGCAGCTTCATAACCATGAAG 9379

      *      *      *      *      *
TCAAGATGGCATTCTCCATCACTGCTATTCCACCATAGCATAGAGTCAGATCTTGGGTGAG 9439

      *      *      *      *      *
GTCACTAGAATGAGACAGGGATCAGGCAAAAGAAAACCAAAATATAACATAGTGATTGCG 9499

      *      *      *      *      *
ACACTGAAAACGACAAATGAAGTATTCTTTTAGAGCTGAAACTGTCACCATCTCTATTCT 9559

      *      *      *      *      *
TAAGGATATTAAAGTGCGTTACAGCCTGAGTAAATGATGATGTCGCCAGCCAGGAGTGT 9619

      *      *      *      *      *
CAGTGTTAGGTGAAGGCTGCTGTTGCCATGGTCACTGAAGGACCGTAGAATCATAGAAAC 9679

      *      *      *      *      *
TTTTGAATTGGAAGGGACCTTAAAGGTACCTATCACCTACACCAACTCCCTGCACTG 9739

      *      *      *      *      *
AACAGGGACACCTACAGCTATATCAGATTGCTCAGGGCCTCATTCAACCTGACCTTGAAT 9799

      *
ATCTCCAGGATGGGCAT _ _ _ _ _

      *      *      *      *      *
GGGACAGCAATTGAGTGCTGAGTATCTCGTCACTGCTCTGCTGCTAGCCTGCTTCCTGC 10709

      *      *      *      *      *
TAGACTACTTCTACAGTATTTTGCAATCAAGGATCTGTTTGAATCTCAAACAGCTAATG 10769

      *      *      *      *      *
TGATCTAGCTGTATTAAATTAATTTGTGTTTCAAGTTCTCGTTACTTTTTATTAACAAACA 10829

      *      *      *      *      *
AGCATGGAGTCCTAGTCTTGTGCGATTTCGTGAGGATAGAGAAAGATACATTCTGAAGGC 10889
      E 8
      TGTGAATTC
                                     10898

```

Abbildung 13

Abbildung 13: Nukleotidsequenz an der 3'-Grenze der
Lysozymgendomäne

Der gestrichelte Abschnitt entspricht demjenigen in Abb.12. Die hoch konservierte Konsensussequenz des in diesem DNA-Bereich lokalisierten CRI-Elementes ist eingerahmt. Drosophila-Topoisomerase II-Konsensussequenzen sind unterstrichen. Die eingezeichneten Restriktionsspaltstellen entsprechen denen in Abb.12.

Mit Hilfe von Computer-Programmen wurde in den bekannten Sequenzdaten auch im 5'-Bereich des Lysozyngens nach CRI-Elementen gesucht. Je ein CRI-Element konnte etwa 5,3 und 1,2 Kb vor der Transkriptionsstartstelle beobachtet werden (siehe auch Abb.15). Im Falle des Lysozyngens scheint, wegen der relativ großen Abstände, keine enge Beziehung zwischen der 5'-Grenze der Domäne und den CRI-Elementen zu bestehen, wie dies für das Ovalbumingen postuliert wurde (74). Diese beiden 5'-CRI-Elemente des Lysozyngens sind in umgekehrter Orientierung zu den 5'-Elementen vor dem Ovalbumingen. Abb.14 zeigt einen Vergleich der hoch konservierten Region aller bislang bekannten CRI-Elemente. Die publizierte Konsensussequenz (76,78) wurde durch die hinzugekommenen Daten abgewandelt. Durch Sequenzvergleiche wurde auch im humanen Papilloma-Virus A1 eine Region mit auffallend großer Homologie zu der CRI-Konsensussequenz gefunden.

Der sequenzierte Bereich von 2,3 Kb wurde auch auf Drosophila-Topoisomerase II-Konsensussequenzen, sowie A- und T-Boxen, wie sie für SAR's charakteristisch sind, abgesucht. In drei Positionen (8672,9481,10772, unterstrichene Regionen) wurden Sequenzen gefunden, bei denen die 6 Kernnukleotide und zumindest 10 von 15 Bp mit der Topoisomerase II-Konsensussequenz übereinstimmen und in einer Position (8259) konnte eine T-Box lokalisiert werden. In SAR's von Drosophila tritt über kürzere DNA-Bereiche eine größere Anhäufung dieser Sequenzen auf (42,43).

CR1 CMa	C-CTC-AA-GGT-CCCTTCCAACCC-AAGCCATTCTATGATT-----CT--GT
CR1 CMc	-----A-GGA--CCTTC--ACC--AG-TCA--CTGTG-TT-----CA--GT
CR1 OVa	C-ATT-GT-GGT-CCTTTTCAACCC-AGGCCATTCTATGATT-----CT--AT
CR1 OVb	C-TTT-GT-GGT-CCCTTCCAACCC-AAACCTTTCTATGATA-----GTTAAT
CR1 OVc	C-A---GT-GGT-CCCTTCCAACCT-CTACAATTCTATGATT-----CTC-AT
CR1 U1a	C-CTT-GT-GGT-CCCTTCCAACCC-AGGCCATTCTGTGATT-----C---AT
CR1 LYa	T-ATTTAA-GGC-CCCTTCCAATCC-AAACCATTCTATGATT-----CT--AG
CR1 LYb	C-CTT-GG-GGTTCCCTTCCAACCCGAGGCCATTCTATGATT-----CT--AT
CR1 LYc	C-ACT-GTCGGT-CCTTTTCAACCC-AGGCTATTCTATGATT-----CT--AT
HPV 1a	CAATT-G--GCG-CC---AGAACCC-A-CTTTTCTATGATTTAAGTTCT--AT

Konsensus C-ATT-GA-GGT-CCCTTCCAACCC-AGGCCATTCTATGATT-----CT--AT

Abbildung 14

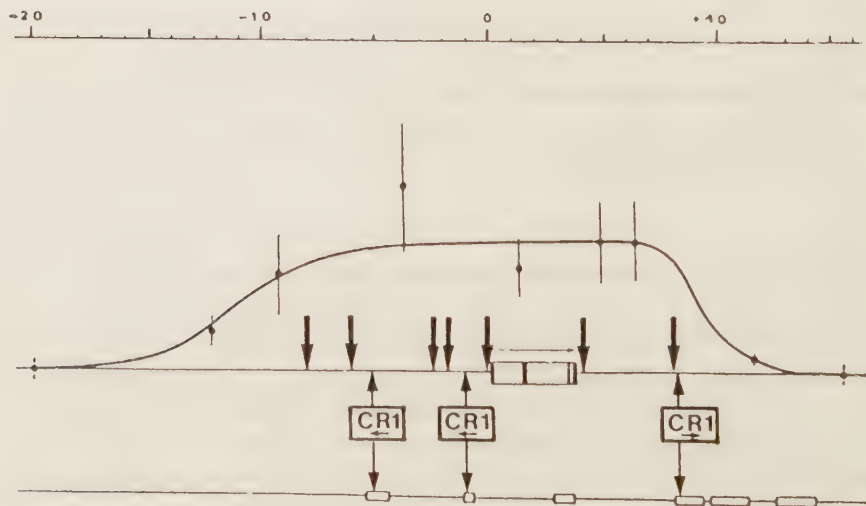


Abbildung 15

Abbildung 14: Sequenzvergleich der hoch konservierten Region aller bislang bekannten CRI-Elemente des Huhns.

In der unteren Linie ist die CRI-Konsensussequenz dargestellt. In jeder Position ist das Nukleotid mit der größten Gemeinsamkeit zwischen den CRI-Elementen angegeben. Mit der Konsensussequenz übereinstimmende Nukleotide sind fettgedruckt. Querstriche geben das Fehlen eines Nukleotids in der entsprechenden Position an. Die Abkürzungen haben folgende Bedeutung:
OV: Ovalbumingen, U1: U1-RNA-Gen, CM: Calmodulin verwandtes Gen, LY: Lysozymgen, HPV 1a: Humaner Papillomavirus A1.

Abbildung 15: Lage und Orientierung von CRI-Elementen in der Lysozymgendomäne.

Innerhalb der Lysozymgendomäne sind die hypersensitiven Stellen durch dicke vertikale Pfeile gekennzeichnet. Der von der CRI-Box aufwärts zeigende dünne Pfeil, gibt die Lage des entsprechenden CRI-Elementes in der Lysozymgendomäne an, der nach unten zeigende Pfeil ordnet ein CRI-Element einem repetitiven Element (leere Kästchen im unteren Teil der Abbildung) des Lysozygens zu. Ein horizontaler Pfeil kennzeichnet die Orientierung des betreffenden CRI-Elementes.

2.4. Untersuchungen zum Mechanismus der Entstehung von hypersensitiven Stellen in der Chromatinstruktur

Normalerweise bindet DNA relativ leicht Nukleosomen. Dies führt dazu, daß praktisch die gesamte eukaryontische DNA mit Histonen komplexiert vorliegt. Unter der Annahme, daß hypersensitive Stellen nukleosomenfreie Regionen sind, stellt sich die interessante Frage, wie 100-200 Bp lange DNA-Stücke frei von Nukleosomen gehalten werden können. Verschiedene Möglichkeiten zur Beantwortung dieser Frage sind vorstellbar (22). Die DNA dieser Region könnte eine Konfiguration annehmen, die mit der Bildung von Nukleosomen unverträglich ist. Eine veränderte Konfiguration könnte unmittelbar von Besonderheiten der DNA-Sequenz herrühren (etwa Z-DNA), oder durch die Proteinbindung an benachbarte Sequenzen induziert werden. Beispiele für induzierte hypersensitive Stellen sind solche, die sich in Abhängigkeit vom Hormonspiegel ausbilden (z.B. HS -1,9 im Lysozymgenbereich und die 5'-ständigen hypersensitiven Stellen im Uteroglobingenbereich). Hier könnte die veränderte Konfiguration durch die Bindung von Proteinen (Steroid-Rezeptor?) bedingt sein.

Eine weitere Vorstellung ist, daß es stabile Protein-DNA-Komplexe gibt, die von Generation zu Generation weitergegeben werden. Solche stabilen Protein-DNA-Bindungen könnten die Ausbildung von Nukleosomen verhindern.

Besonders bemerkenswert ist die hypersensitive Stelle HS +3,9. Sie ist völlig gewebsunspezifisch, scheinbar nicht korreliert mit der Aktivität des Gens und die einzige hypersensitive Stelle, die in den völlig abgeschalteten Erythrozyten zugänglich ist (44). Dieses Verhalten läßt zwei Deutungsmöglichkeiten zu. Entweder existiert in allen Geweben des Huhns ein Protein, daß an diese Stelle der DNA bindet und somit die ununterbrochene Bedeckung der Region mit Nukleosomen verhindert, oder die DNA-Sequenz besitzt eine Konfiguration, die eine Wicklung um Histonoktamere unmöglich macht. Um zwischen den beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde ein DNA-Fragment, das diese hypersensitive Stelle enthält, in ein Hefeploid eingebaut und in Hefezellen eingebracht. Für

den Fall, daß in Hefe dieses Fragment in Nukleosomen verpackt wird, könnte man ausschließen, daß die DNA-Sequenz an sich eine Wicklung um Nukleosomen verhindert.

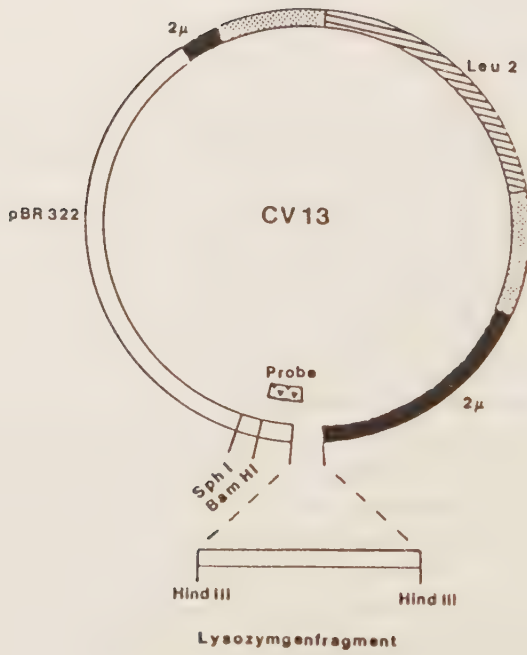
2.4.1. Verwendung des shuttle-Vektors CV13 zur Transformation von Lysozymgenfragmenten in Hefe (*S. cerevisiae*)

Lysozymgenfragmente wurden in die HindIII-Spaltstelle des Vektors CV13 eingebaut. In Abb.16A ist dieser Vektor schematisch dargestellt. CV13 enthält den Replikationsursprung des Hefe-2 μ -Plasmids und den des Plasmids pBR 322. Daher ist eine Replikation und Selektion des Vektors in *E.coli*, als auch in *Sacharomyces cerevisiae* möglich. Als Selektionsmarker dient das *Leu-2*-Gen der Hefe (79). Abb.16B zeigt die eingebauten Lysozymgenfragmente und deren Orientierung im Plasmid. Die Bezeichnung der Restriktionsspaltstellen entspricht der in Abb.10. Der Hefestamm DBY 747a wurde mit den verschiedenen CV13-Konstrukten nach der Lithiumacetat-Methode transformiert (80). Die Bezeichnung der transformierten Hefestämme ist in Abb.16B angegeben. Diese vorbereitenden Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit J. Hauber ausgeführt.

2.4.2. Die 3'-Region des Lysozygens bleibt auch nach Transformation in Hefe in einer hypersensitiven Konformation

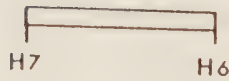
Isolierte Zellkerne der transformierten Hefestämme 16 Lys-1 und 16 Lys-3 wurden mit steigenden Mengen DNAaseI verdaut. Die gereinigte DNA wurde mit BamHI nachgespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Als Hybridisierungsprobe für die indirekte Endmarkierung diente das BamHI-EcoRI-Fragment des Plasmids pBR 322, welches in den Vektor M13 kloniert vorlag, und dessen Lage im Verhältnis zum CV13 in Abb.16A angegeben ist.

A



B

a. 15 Lys-3



b. 16 Lys-1



c. 16 Lys-3

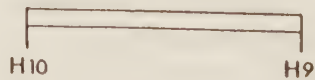


Abbildung 16

Abbildung 16:

A: Schematische Darstellung des Hefe-shuttle-Vektors CV13 (YeP13).

Die Lage des Leu2-Gens, sowie die vom Plasmid pBR 322 und vom 2 μ -Plasmid der Hefe abgeleiteten DNA-Fragmente ist angegeben. Lysozymgenfragmente wurden in die HindIII-Stelle eingebaut. DNA aus transformierten Hefezellkernen wurde mit SphI (15Lys-3) oder BamHI (16Lys-1,16Lys-3) nachgespalten. Die indirekte Endmarkierung erfolgte mit der angegebenen Probe (Balken mit Dreiecken).

B: Transformierte Hefeklone, die bei Chromatinstudien eingesetzt wurden (a-c).

Es ist jeweils das in den CV13-Vektor eingebaute Restriktionsfragment und dessen Orientierung angegeben. Die Bezeichnung der Restriktionsspaltstellen entspricht der in Abb.10.

Die erhaltenen Autoradiogramme sind in Abb.17A dargestellt. Die Spalten a-f zeigen den Verlauf des DNAaseI-Verdau von Zellkernen aus dem Hefestamm 16 Lys-1. Die Spalten g-l zeigen das Ergebnis der Analyse des transformierten Hefestammes 16 Lys-3, welcher das entsprechende 3'-Fragment des Lysozymgens in umgekehrter Richtung enthält. Die Autoradiogramme zeigen eindeutig DNAaseI-hypersensitive Stellen (gekennzeichnet durch Kreis und Quadrat). Beim Einbau des Lysozymgenfragmentes in umgekehrter Richtung ins Plasmid, treten die hypersensitiven Stellen, in Bezug auf die zu Grunde liegende DNA-Sequenz, an den gleichen Positionen auf. Dieses deutet auf eine Sequenzabhängigkeit der Ausbildung dieser hypersensitiven Regionen hin.

In Abb.17B sind DNAaseI-Inkubationen von freier DNA als Kontrollversuche abgebildet. Die freie DNA zeigt ein deutlich unterschiedliches Abbaumuster als die gleichen Konstrukte nach Verpackung in Hefechromatin. Hypersensitive Stellen wie sie beim Verdau von Hefekernen (17Ae und 17Aj) beobachtet werden, treten in der freien DNA nicht auf (Abb.17B).

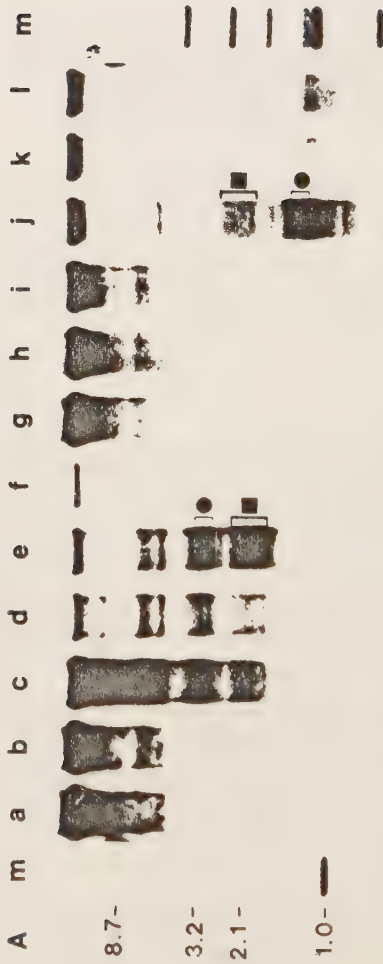


Abbildung 17: Kartierung von hypersensitiven Stellen in der Chromatinstruktur von Lysozymgenfragmenten in *Sacharomyces cerevisiae* und auf freier DNA der für die Transformation eingesetzten CV13-Konstrukte.

A: Verlauf des DNAaseI-Verdaus von Zellkernen der transformierten Hefestämme 16Lys-1 (a-f) und 16Lys-3 (g-l). 5µg DNA wurden pro Bahn aufgetragen. Spalte a,g: ohne DNAaseI; Spalte b,h: 8 U DNAaseI; in den jeweils folgenden Spalten wurde die DNAaseI-Konzentration verdoppelt. Beide Hefestämme enthalten das gleiche Lysozymgenfragment (H9-H10), jedoch in unterschiedlicher Orientierung. Das Muster der Hypersensitivität zeigt ebenfalls eine umgekehrte Orientierung. Sich entsprechende Bereiche sind mit einem Punkt bzw. einem Quadrat gekennzeichnet.

B: Kartierung DNAaseI-hypersensitiver Stellen auf freier DNA der CV13-Konstrukte die bei der Transformation der entsprechenden Hefezellklone von Teilabbildung A eingesetzt wurden (a-g=16Lys-1, h-l=16Lys-3). 0.5µg DNA wurde pro Bahn aufgetragen. Spalte a,h: ohne DNAaseI, Spalte b,i: 1.25 U DNAaseI; in den jeweils folgenden Bahnen wurde die DNAaseI-Konzentration verdoppelt. Die Längenmarker entsprechen der Abb.2.

Die Lage der hypersensitiven Bereiche auf dem Lysozymgenfragment H9-H10 sind in Abb.18, relativ zum 3'-Ende des Lysozygens und im Vergleich zu den hypersensitiven Stellen, die im Ovidukt und in Erythrozyten zu finden sind, dargestellt. Es zeigt sich, daß HS +3,9 in der Hefe mit einer Ausdehnung von etwa 600 Bp wesentlich länger als im Ovidukt oder in Erythrozyten ist und sich über das dritte Exon hinaus, ins Gen erstreckt. Ob dieser Unterschied auf abweichenden Eigenschaften von Hefe-Histonen, auf die Abwesenheit des Histon H1 in Hefe, oder auf eine vermehrte Beteiligung von Hefe-Nichthistonproteinen zurückzuführen ist, bleibt unklar. Fest steht, daß die DNA-Region 3' vom Lysozymgen geradezu prädestiniert zu sein scheint, eine besonders zugängliche Chromatinstruktur anzunehmen.

Weiter distal vom Gen gelegene hypersensitive Regionen treten in der Hefe ebenso wie im Ovidukt oder in Erythrozyten auf (kurze Balken in Abb.17, bei der Hefe mit einem Kreis gekennzeichnet).

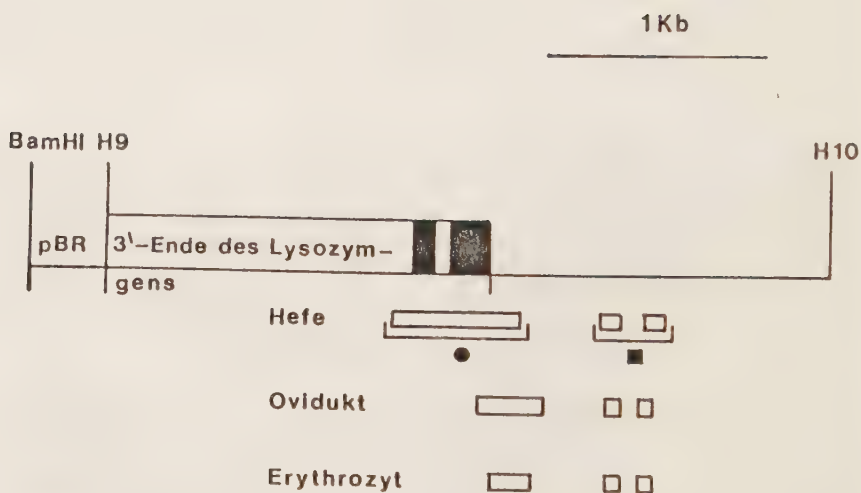


Abbildung 18: Vergleichende Darstellung der hypersensitiven Bereiche am 3'-Ende des Lysozymgens im Ovidukt- und Erythrozytenchromatin des Huhns und im Chromatin transformierter Hefezellen.

Die Ausdehnung und Lage der hypersensitiven Regionen ist jeweils als offener Balken unterhalb des Lysozymgenfragmentes H9-H10 dargestellt.

Da man sie auch in proteinfreier DNA beobachtet (44), scheinen diese hypersensitiven Stellen keine Eigenschaft der Chromatinstruktur, sondern der DNA-Sequenz zu sein, und wurden nicht weiter analysiert.

Als Kontrolle wurde der Hefestamm 15 Lys-3 untersucht, der ein Lysozymgenfragment enthält, auf welchem den hypersensitiven Stellen HS -0,1 und HS -0,7 entsprechende DNA-Sequenzen lokalisiert sind. Diese hypersensitiven Stellen werden, im Gegensatz zur bisher beschriebenen HS +3,9, nur im aktiven Gewebe ausge-

bildet. Es war interessant, ob diese gewebsspezifischen Stellen auch in der Hefe auftreten. Die Abb.19 zeigt den Verlauf des DNAaseI-Verdaus. Der schwarze Balken rechts gibt den Bereich des inserierten Lysozymgenfragmentes an. Es können in diesem Bereich keine auffälligen hypersensitiven Stellen beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit der Vermutung, daß im Huhn gewebsspezifische Faktoren für die Ausbildung von HS -0,1 und HS -0,7 notwendig sind, die in der Hefe fehlen.



Abbildung 19: Kartierung DNAaseI-hypersensitiver Stellen auf dem Lysozymgenfragment H7-H6 in *Sacharomyces cerevisiae*.

Zellkerne des transformierten Hefestammes 15Lys-3 wurden mit steigenden Mengen DNAaseI verdaut. Spalte a: ohne DNAaseI, Spalte b: 2 U DNAaseI, in den folgenden Spalten c-f ist die DNAaseI-Konzentration jeweils verdoppelt. 5µg DNA wurden pro Bahn aufgetragen. Der Längenstandard links entspricht dem der Abb.2. Der schwarze Balken rechts gibt den Bereich des in den Vektor CV13 klonierten Lysozymgenfragmentes H7-H6 an. In diesem Bereich treten keine auffälligen hypersensitiven Strukturen auf.

2.4.3. Nukleotidsequenz im Bereich der hypersensitiven Stelle HS +3,9

Ausgehend von dem Ergebnis, daß HS +3,9, in modifizierter Form, auch in der Hefe auftritt, wurde der Möglichkeit nachgegangen, ob diesem hypersensitiven Bereich eine Nukleotidsequenz zu Grunde liegt, die nur schwer in Nukleosomen zu verpacken ist. Zu diesem Zweck wurden die letzten 40 Bp des Lysozymgens und etwa 350 Bp von dessen 3'-Flanke sequenziert. Die Nukleotidsequenz ist in Abb.20 dargestellt.

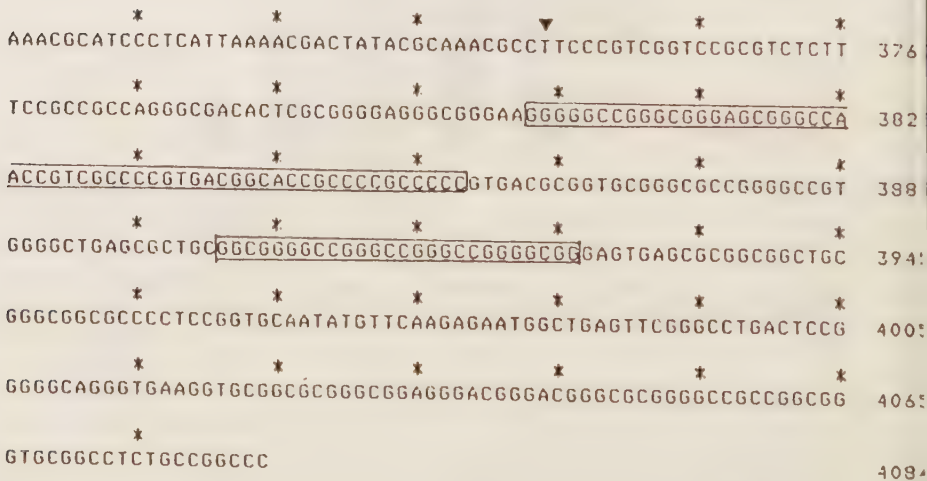


Abbildung 20: Nukleotidsequenz des 3'-Endes und der 3'-angrenzenden Region des Lysozymgens.

Das Ende des Lysozymgens ist durch ein schwarzes Dreieck gekennzeichnet. Besondere Sequenzmerkmale (Stamm- und Schleifenstruktur, GC-Box) sind eingrahmt.

Die ermittelten letzten 40 Bp des Lysozymgens stimmen mit der bekannten cDNA-Sequenz überein (81). Innerhalb der Region 30 Bp 3' der Polyadenylierungsstelle (P), treten bei vielen eukaryontischen Genen konservierte Sequenzelemente auf, die als "G/T-Cluster" bezeichnet werden. Diese Bereiche sind gekennzeichnet durch eine Überrepräsentation des Trinukleotids TGT, das manchmal in Verbindung mit oligoT-Abschnitten auftritt (82,83).

Sequenzelemente, die diesem "G/T-Cluster" entsprechen, sind beim Lysozymgen nur angedeutet und in Abb.21 zwischen der Polyadenylierungsstelle (P) und der Stamm- und Schleifen-Struktur mit angegeben. 60 Bp hinter dem 3'-Ende des Lysozymgens beginnt eine Region, die etwa 180 Bp umfaßt, und durch einen sehr großen GC-Reichtum gekennzeichnet ist (87%). Dieser Bereich fällt mit der Lage von HS +3,9 zusammen. Einen Eindruck vom GC-Reichtum dieser Sequenz vermittelt die Abb.22. Diese Sequenz läßt sich im Einzelstrang zu einer Stamm- und Schleifenstruktur falten. Innerhalb der Schleife treten auffällige Komplementaritäten auf, jedoch ist hier eine Basenpaarung nicht möglich, da beide Stränge die gleiche Orientierung aufweisen. 40 Bp 3' vom Stamm dieser Schleife folgt eine "GC-Box" mit perfekter Spiegelsymmetrie (Abb. 21). Möglicherweise spielen diese Strukturen auf RNA-Ebene eine Rolle bei der Transkriptionstermination. Vorläufige in vitro Transkriptionsversuche mit Oviduktkernen deuten darauf, daß die Transkriptionstermination in dem gezeigten Bereich stattfindet, auf jeden Fall aber vor der Sal7-Stelle etwa 600 Bp stromabwärts der GC-Box (s. Abb.10).

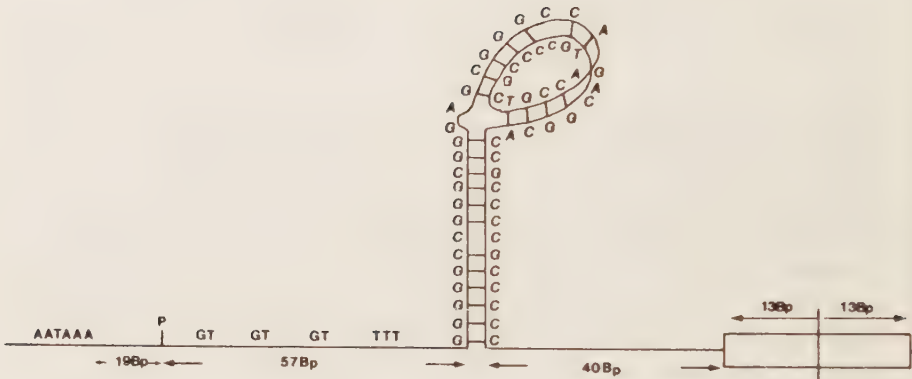


Abbildung 21: Besondere Sequenzmotive im 3'-flankierenden Bereich des Lysozymgens.

19 Bp hinter dem Polyadenylierungssignal (AATAAA) liegt die Polyadenylierungsstelle (P). Zwischen der Polyadenylierungsstelle und dem Stamm der Stamm- und Schleifenstruktur sind Sequenzelemente angegeben, die beim Lysozymgen dem GT-Cluster entsprechen. Die Schleife ist so gezeichnet, daß die durch eine Duplikation der komplementären Sequenz eines Teils der Schleife entstehenden Komplementaritäten zwischen den Nukleotiden des Einzelstrangs aufgezeigt werden. Eine Basenpaarung ist wahrscheinlich nicht möglich, da beide Stränge in der Schleife die gleiche Orientierung besitzen. 40 Bp nach der Stamm- und Schleifenstruktur folgt eine ausschließlich von GC-Paaren gebildete Box mit perfekter Spiegelsymmetrie.

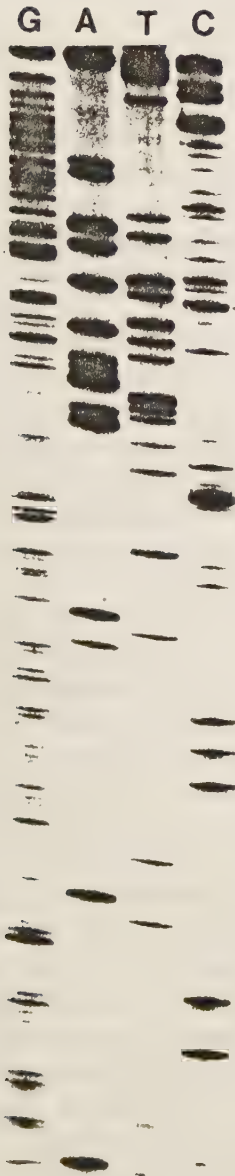


Abbildung 22: Autoradiographie eines Sequenzgels.

Dargestellt ist ein Ausschnitt der Sequenz der 3'-angrenzenden Region des Lysozyngens. Die Reihenfolge der aufgetragenen Sequenzreaktionen für die einzelnen Nukleotide ist durch Großbuchstaben angegeben. Die Abbildung vermittelt einen Eindruck vom GC-Reichtum der hypersensitiven Stelle HS +3,9

3. Diskussion

3.1. Die DNAaseI-hypersensitiven Stellen des Uteroglobingens

3.1.1. Aktiver und inaktiver Zustand des Kaninchenuteroglobingens sind durch unterschiedliche Muster DNAaseI-hypersensitiver Stellen gekennzeichnet

Das Uteroglobingen des Kaninchens wird in diversen Geweben von verschiedenen Hormonen kontrolliert. Die Lunge repräsentiert den glucocorticoidabhängigen, das Endometrium (die Schleimhaut der Gebärmutter) den progesteronabhängigen, aktiven Zustand. Die Leber ist ein Glucocorticoid-Zielorgan, in dem das Uteroglobingen inaktiv ist (3). Drei verschiedene Aktivitätszustände des Gens wurden hinsichtlich des Auftretens hypersensitiver Stellen in der Chromatinstruktur untersucht.

Im Lungengewebe konnten keine hypersensitiven Stellen nachgewiesen werden, obwohl das Uteroglobingen in diesem Gewebe unter Glucocorticoid-Kontrolle exprimiert wird. Dieser Befund ist ungewöhnlich, da bislang vor allen Genen im aktiven Zustand hypersensitive Stellen gefunden wurden. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, daß der Anteil der Uteroglobin-exprimierenden Lungenzellen weniger als 10% der Zellen in diesem Organ ausmacht (55). Hypersensitive Stellen werden durch den großen Überschuß der DNA von nicht exprimierenden Zellen überdeckt. Ihr Nachweis ist mit den jetzigen Methoden nicht möglich. Ferner beträgt der Anteil der Uteroglobin-mRNA in der Lunge 0,004-0,005% der Gesamt-RNA und ist daher wesentlich geringer als im progesteroninduzierten Endometrium, jedoch vergleichbar mit dem östrogeninduzierten Zustand im Endometrium, wo der spezifische mRNA-Gehalt vergleichbar gering ist (84). Im östrogeninduzierten Endometrium sind die hypersensitiven Stellen auch nur schwach erkennbar.

Im aktiven Endometrium treten vor dem Uteroglobingen drei hypersensitive Stellen auf: HS -0,1, HS -2,4 und HS -3,7. Diese drei hypersensitiven Stellen sind insofern gewebsspezifisch, als sie in Leber und Lunge von Kontrolltieren nicht auftreten und in inaktiven Geweben weder mit Glucocorticoiden, noch mit Östrogen allein, noch mit Östrogen und Progesteron induziert werden können. Neben diesen gewebsspezifischen Stellen vor dem Gen existiert eine hypersensitive Stelle 4,1Kb hinter der Transkriptionsstartstelle. HS +4,1 tritt in allen bislang untersuchten Geweben auf und ist unabhängig vom hormonellen Zustand des Tieres. Die drei hypersensitiven Stellen vor dem Gen sind wahrscheinlich an der progesteronkontrollierten Expression des Uteroglobingens beteiligt, während die Stelle hinter dem Gen, wenn überhaupt, eine andere Funktion hat, die nicht notwendigerweise mit der Transkriptionsaktivierung des Gens in Verbindung steht. Jeweils eine gewebsspezifische hypersensitive Stelle hinter dem 3'-Ende des Gens wurde auch beim Lysozym (38) und beim Vitellongenin (48) gefunden. Möglicherweise sind 3'-hypersensitive Stellen an der Transkriptionstermination beteiligt. Dafür sprechen unter anderem folgende Befunde:

Beim humanen $\alpha 1(I)$ -Kollagengen ist die unterschiedliche Transkriptlänge in Fibroblastenzellen und in Plazentagewebe mit einem unterschiedlichen Muster von 3'-Stellen korreliert (85). Beim Ovalbumingen des Huhns liegt die 170 Bp-Region, in welcher 90% der Primärtranskripte terminieren, innerhalb einer hypersensitiven Region (86). Eigene Befunde (nicht gezeigt) deuten darauf, daß DNA-Sequenzen, die nur 600 Bp hinter der hypersensitiven Stelle HS +3,9 des Lysozymgens liegen, nicht mehr transkribiert werden, mit anderen Worten, daß möglicherweise die Transkriptionsterminierung des Lysozymgens in HS +3,9 erfolgt. In die molekularen Mechanismen der Transkriptionstermination sind somit spezifische Chromatinstrukturen einbezogen.

3.1.2. Das Muster von hypersensitiven Stellen bei einfach und komplex regulierten Genen

Alle bislang untersuchten Gene im aktiven Zustand besitzen mindestens eine hypersensitive Stelle in der Chromatinstruktur, die im inaktiven Zustand des Gens nicht ausgebildet wird und im Promotorbereich liegt (29,48,87,88,89,90,91,92,93,97). In einigen Fällen (β -Globingen, PH05-Gen der Hefe, SV40) konnte gezeigt werden, daß diese hypersensitive Region nukleosomenfrei ist (29,30,94,95,96). Diese hypersensitiven Stellen sind jedoch nicht proteinfrei. DNA-bindende Faktoren konnten in einigen Fällen charakterisiert werden (32,98,100), wobei die Bindung oft mit der Induktion der Transkription korreliert. Eine hypersensitive Stelle im Promotorbereich scheint demnach eine notwendige, aber nicht immer ausreichende Erfordernis für die Aktivierung eines Gens zu sein. Trotz der Allgemeingültigkeit dieses Merkmals ist erstaunlich, daß die Lage der promotornahen hypersensitive Stelle nicht exakt die gleiche Region relativ zur Transkriptionsstartstelle umfaßt. Feinkartierungen dieser DNAaseI-Stelle haben z.B. gezeigt, daß im Falle des Uteroglobingens weder die Transkriptionsstartstelle selbst, noch die TATA-Box, jedoch die hauptsächliche CAAT-Box innerhalb der hypersensitiven Region liegt (Abb.23). Ähnlich ist die Situation beim Hühner- β -Globingen (29). Im Gegensatz hierzu liegen beim Lysozymgen diese Sequenzelemente innerhalb der hypersensitiven Region, wobei die Ausdehnung der Region in Makrophagen (konstitutive Expression) etwas größer ist, als im Ovidukt (hormonregulierte Expression) (44).

Gene, die komplexen Regulationsmechanismen unterliegen (Entwicklungskontrolle, Hormonabhängigkeit, Gewebsspezifität etc.), zeigen außer der promotornahen hypersensitiven Stelle ein ganzes Muster hypersensitiver Regionen in der Chromatinstruktur.

deren allmähliches Verschwinden nach Hormonentzug sind aufs Engste mit der Menge an uteroglobinspezifischer mRNA, d.h. mit der Transkription korreliert (55).

Zwischen den drei hypersensitiven Stellen 5' des Uteroglobins bestehen Unterschiede. Östrogen alleine bewirkt nur ein schwaches Auftreten der hypersensitiven Stellen HS -0,1 und HS -3,7, und führt nur zu einer dreifachen Zunahme an Uteroglobin-mRNA. Für die Etablierung von HS -2,4 ist unbedingt eine nachfolgende Progesteronbehandlung notwendig, die, im Vergleich zu Kontrolltieren, zu einer 12-fachen Steigerung der an Polysomen gebundenen Uteroglobin-mRNA führt (3). Die schwache Ausprägung der hypersensitiven Stellen mit Östrogen allein korreliert mit einer geringen Transkriptionsaktivität. Zur vollen Induktion, sowohl der hypersensitiven Stellen als auch der Transkription ist Progesteron nötig. Bei der Induktion der Entwicklung des Endometriums mit Östrogen alleine bleibt der relative Anteil der Uteroglobin produzierenden epithelialen Zellen geringer als bei der Induktion mit Östrogen und Progesteron. Dies würde experimentell zu einer schwächeren Ausprägung der hypersensitiven Stellen führen.

Die Abhängigkeit der 5'-seitigen hypersensitiven Stellen von Steroidhormonen läßt vermuten, daß ihre Entstehung unmittelbar mit einer Bindung des Hormonrezeptor-Komplexes korreliert. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Beato sind eine Reihe von Bindungsstudien des Progesteron-Rezeptor-Komplexes mit Uteroglobingen-flankierenden DNA-Sequenzen durchgeführt worden (55). Diese Studien zeigten eindeutig, daß nur die weit vom Gen entfernten hypersensitiven Stellen Bindungssequenzen enthalten. Die promotornahe Stelle enthält eindeutig keine Rezeptor-Bindungsstelle, weder im Filterbindungstest noch bei der DNAaseI-"footprinting"-Analyse. Daraus folgt, daß die Wirkung des Progesterons auf die Ausbildung von hypersensitiven Stellen mittelbar über andere aktivierte Proteine erfolgen kann. Auch eine Fernwirkung der Rezeptorbindung weit vor dem Gen könnte als Ursache der Entstehung der promotornahen hypersensitiven Stelle diskutiert werden.

Die Untersuchungen in den letzten drei Jahren haben ergeben, daß der Hormon-Rezeptor-Komplex in Verbindung mit den spezifischen Bindungssequenzen ein klassisches Beispiel für einen gewebsspezifischen Enhancer mit transaktivierendem Faktor darstellt. Diese Ansicht stammt aus Befunden, daß Hormonrezeptorbindungsstellen in variablen Abständen und in verschiedenen Orientierungen zum Gen vorliegen. Glucocorticoidrezeptor-Bindungsstellen des menschlichen Metallothioneingens und des Hühnerlysozymgens liegen zwischen 50-300 Bp vor dem betreffenden Gen (104,105). Beim Tyrosin-Aminotransferase-Gen der Ratte liegt die Bindungsstelle 2,4 Kb (106), beim Uteroglobingen 2,6 Kb vor dem Gen (37) und beim Gen für das menschliche Wachstumshormon 100 Bp nach der Transkriptionsstartstelle im ersten Intron (107). Beim Hühnerlysozymgen liegen die Bindungssequenzen, im Vergleich zu den anderen Genen, in umgekehrter Orientierung. Diese Eigenschaften zeichnen einen Enhancer aus.

3.1.4. Die progesteronabhängige DNAaseI-hypersensitive Stelle HS -2,4 setzt sich aus ungewöhnlichen DNA-Sequenzelementen zusammen und enthält zwei Progesteronrezeptor-Bindungsstellen

Die Mechanismen der Enhancer-Wirkung sind weitgehend unbekannt. Unter verschiedenen Möglichkeiten werden zwei Modelle häufig diskutiert. Das eine Modell postuliert eine Kommunikation zwischen dem Enhancer und dem Promotor aus der Ferne, entlang des nukleosomal organisierten Chromatins. Beispielsweise könnte die Bindung des transaktivierenden Faktors an die Enhancersequenz zu alternativen DNA-Strukturen führen (Z-DNA, nicht B-DNA), die lokale Spannungszustände bewirken (108). Es gibt Anzeichen dafür, daß nukleosomal organisierte DNA thermisch weniger flexibel ist als die freie DNA, und damit in der Lage wäre, Signale über eine größere Distanz zu übertragen (109). DNAaseI-hypersensitive Stellen könnten effizient entlang der DNA im Chromatin kommunizieren, da die nukleosomale Organisation des Chromatins die Energieverluste durch Konformationsänderungen minimalisiert.

Eine alternative Vorstellung ist, daß die Elemente unmittelbar miteinander kommunizieren. Dies könnte durch Schleifenbildung des Chromatins zu direkter Wechselwirkung der Proteine zwischen regulatorischen Regionen (hypersensitive Stellen, Enhancer) führen (110).

Die hypersensitive Region HS -2,4 zeichnet sich durch eine ungewöhnliche DNA-Sequenzorganisation aus, die Anlaß zu Spekulationen über eine Fernwirkung gibt. Sie beherbergt 2 Progesteron-Rezeptor-Bindungsstellen in einer auffälligen Umgebung und besteht aus sich wiederholenden Sequenzelementen. Es ist vorstellbar, daß diese aus dem Rahmen fallende DNA-Sequenz nach Hormonrezeptor-Bindung eine alternative Konformation annehmen könnte. Dies wiederum spräche für einen Fernwirkungsmechanismus.

Abb.24 zeigt die Sequenzorganisation der hypersensitiven Region HS -2,4. Sie besteht aus unterschiedlichen, jedoch klar verwandten Oktanukleotid-Boxen folgender Konsensussequenz:



Diese Boxen treten in beiden Orientierungen auf und sind durch eine unregelmäßige Zahl von Basenpaaren voneinander getrennt. Vier der Boxen (8/9 und 16/17) überlappen paarweise über ein bzw. vier Basenpaare. Diese Sequenzorganisation dehnt sich ungefähr 70 Bp an der 5'-Seite und ungefähr 20 Bp über die 3'-Seite der hypersensitiven Chromatinstruktur aus. Fünf der Boxen überlappen mit Bindungsstellen des Progesteron-Rezeptors. Die Bedeutung dieser ungewöhnlichen Sequenz ist unbekannt. Ihre mögliche Rolle bei einer Signalübertragung über Distanz (Fernwirkungsmodell) wurde im vorhergehenden Abschnitt diskutiert. Einige dieser Boxen könnten auch Erkennungssequenzen für Endometrium-spezifische Nichthistonproteine darstellen. Die kooperative Bindung dieser Nichthistonproteine würde die Ausbildung von Nukleosomen verhindern oder vorhandene Nukleosomen aus diesem Bereich verdrängen, was in beiden Fällen zu einer hypersensitiven Chromatinstruktur führt. Ferner wäre auch denkbar, daß die

wiederholten Sequenzmotive selbst der Bildung von stabil plazierten Nukleosomen entgegen wirken, in dem sie die Bindungskonstante der Histonoktamer-DNA-Wechselwirkung herabsetzen. Zu erwähnen ist noch, daß in regulatorischen Regionen anderer Gene eine Anhäufung des Trinukleotids GTG/CAC festgestellt wurde. Auch in diesen Arbeiten wurde vermutet, daß diese Sequenz eine ungewöhnliche Konformation annehmen könnte (111).

3.1.5. Auch die hypersensitive Stelle HS -3,7 korreliert mit einer Hormonrezeptor-Bindungsstelle.

Auf Grund der Entdeckung einer hormonabhängigen DNAaseI-Region bei -3,7, wurden von der Arbeitsgruppe Beato Filterbindungsstudien mit den beiden Hormonrezeptoren durchgeführt. Es zeigte sich, daß sowohl der Glucocorticoid- als auch der Progesteron-Rezeptor das Eco RI-Fragment, welches die DNAaseI-hypersensitive Stelle trägt, präferentiell binden (55). Die Nukleotidsequenz in diesem Bereich enthält eine Glucocorticoid-Konsensussequenz bei -3,650. Obwohl die Bindungsstudien durch "footprinting"-Analysen noch nicht bestätigt sind, muß man annehmen, daß diese Konsensussequenz ein Bindungsort für die beiden Hormonrezeptoren ist. Die Ergebnisse legen nahe, daß die hormonelle Regulation des Uteroglobins von DNA-Regionen aus erfolgt, die beinahe bis zu vier Kb vor der Promotorregion des Gens liegen. Wie sich die durch die Rezeptor-Bindung ausgelösten Veränderungen weit vor dem Gen auf die hypersensitive Stelle am Promotor auswirken konnte, ist bereits im Zusammenhang mit der hypersensitiven Stelle HS -2,4 erörtert worden.

A

714

CACGTCATAGGGGCACACAGTAATTCACCTAGCAAGTCTCTGATTGGTGGATTGTTTAGAACCCGTG

--DNase I--

CTCTTAACTACGTGTCTCCACGGCCTGCAAAATAGCACCTGACACAAAGGCCTGTTCACTGATTTCG

--DNase I----

Rsal.

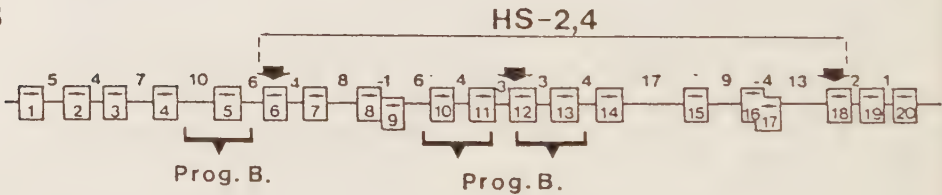
TCCAAGGTGCCTGTTTAGTGAACATCAAGTACTTGGCTTTGTGGGGCCAATCAAGCAAAGGATTTCG

--DNase I--

976

TGCCAGTAAACACCGTATGGTGGGCCGGCTAACCAAAGGGGTGGGGAGAGGTGCACAGTGTGTG

B



C

4 G A T T G G T G
 5 A A C C C G T G
 6 A C T A C G T G
 11 C C A A G G T G
 12 G T T T A G T G
 13 A T C A A G T A
 14 G C T T T G T G
 15 G A T T C G T G
 17 G T A T G G T G
 18 A A G G G G T G
 19 G A G A G G T G
 20 A C A G T G T G

1 C A C G T C A T
 2 C A C A C A G T
 3 C A C C T A G C
 7 C A C G G C C T
 8 C A C C T G A C
 9 C A C A A A G G
 10 C A C T G A T T
 16 C A C C G T A T

$\begin{array}{c} T G \\ P u P y P y - G T G \\ A C \end{array}$

$\begin{array}{c} C \\ C A C C N P u P u P y \\ G \end{array}$

Abbildung 24: Die Nukleotidsequenz, die die DNAaseI-hypersensitive Stelle HS -2,4 umfaßt, besteht aus intern wiederholten Oktanukleotidelementen.

A: Die Numerierung der Basen ist die gleiche wie bei (37), die Oktanukleotide sind unterstrichen.

B: Häufigkeit und Orientierung (kleine horizontale Pfeile) der wiederholten Oktanukleotide ist gezeigt. Drei Hauptschnittstellen der DNAaseI (dicke vertikale Pfeile) und die Ausdehnung der hypersensitiven Stelle (horizontaler Doppelpfeil), sowie die drei Progesteron-Rezeptor-Bindungsstellen (Klammern) in diesem Bereich sind dargestellt. Die Zahlen zwischen den Einheiten geben den Abstand in Bp an. Die Oktanukleotide 8/9 und 16/17 überlappen sich.

C: Sequenz der 20 Oktanukleotideinheiten und Konsensussequenz. Die Zahlen geben die Reihenfolge des Auftretens an und entsprechen denjenigen in (B).

3.1.6. Vergleich des Uteroglobingens mit anderen Steroidhormon-kontrollierten Genen

Es ist eine interessante Frage, ob verschiedene Steroid-kontrollierte Gene Ähnlichkeiten in den Mustern ihrer hypersensitiven Stellen aufweisen. Wäre das so, würde dies auf ein einheitliches Bild der Hormonwirkung deuten. Die Untersuchung an verschiedenen Genen lassen jedoch kein einheitliches Bild entstehen.

Die größten Ähnlichkeiten mit dem Uteroglobingen, in Bezug auf die 5'-hypersensitiven Stellen, besitzt das Hühnerovalbumingen (90). Vier gewebsspezifische DNAaseI-hypersensitive Stellen (-0,1, -0,8, -3,3, -6,0) kennzeichnen im Ovidukt die 5'-flankierende Region dieses Gens. Analog zum Uteroglobingen werden alle diese 5'-hypersensitiven Stellen durch Hormonapplikation (Diethylstilböstrol) induziert und verschwinden alle weitgehend wieder nach Absetzen des Hormons. Das Auftreten der hypersensitiven Stellen ist hier ebenfalls direkt mit der Transkription korreliert. Zytologische Untersuchungen konnten in diesem Fall

zeigen, daß das Verschwinden der hypersensitiven Stellen nicht auf einem Verlust von tubulären Drüsenzellen, die das Ovalbumin exprimieren, sondern durch den abnehmenden Hormonspiegel bedingt wird.

Ein anderes Verhalten der 5'-hypersensitiven Stellen findet man beim Vitellogenin, beim apo-VLDL-Gen und beim Lysozymgen des Huhns. Als Konsequenz der Hormonapplikation werden in der 5'-Region des Hühner-Vitellogenins drei hypersensitive Stellen induziert, von denen jedoch zwei auch nach Ende der Östrogenbehandlung persistieren. Nur eine Stelle, 0,7 Kb vor dem Gen, wird induziert und nach Absetzen des Hormons wieder rückgängig gemacht (48). Beim Hühnerlysozymgen tritt unter mehreren hypersensitiven Stellen eine reversibel induzierbare 1,9 Kb vor dem Gen auf (39), sowie in verschiedenen Abständen vor anderen Genen (53,54). Filterbindungsstudien legen eine mögliche Verwandtschaft zwischen der instabilen hypersensitiven Stelle vor dem Vitellogenin und der Bindung des Östrogenrezeptors nahe (112).

Im Unterschied zum Uteroglobins- und Ovalbumin reagieren bei den obigen Beispielen nur eine oder wenige von mehreren hypersensitiven Stellen auf das Absetzen und die erneute Applikation des Hormons.

Diese Unterschiede bei den einzelnen Genen sind doch so erheblich, daß man nicht von einem einheitlichen Bild der Hormonwirkung auf die Chromatinstruktur und somit auf den Mechanismus der Transkriptionsaktivierung schließen kann.

Das Uteroglobins- und das Lysozymgen stellen insofern eine Besonderheit dar, als sie im Gegensatz zum Vitellogenin-, Ovalbumin- und apo-VLDL-Gen nicht nur in einem einzigen Hormonzielorgan exprimiert werden, sondern in mehreren Zelltypen unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen.

3.2. Die DNAaseI-sensitive Chromatindomäne des Lysozymgens

3.2.1. Die Ausdehnung der DNAaseI-sensitiven Domäne

Aktive Gene weisen eine aufgelockerte Chromatinkonformation auf. Nach intensivem DNAaseI-Abbau manifestiert sich dies in einer schnellen Überführung der betreffenden DNA in kurze, nicht mehr hybridisierbare Fragmente. Diese als allgemeine Sensitivität bekannte Eigenschaft betrifft nicht nur die codierenden Regionen, sondern erstreckt sich viele Kb in die 5' und 3'-flankierenden Bereiche des Gens. In diesem Zusammenhang ist die Frage interessant, welche Ausdehnung die erhöhte Sensitivität um das Gen besitzt, und wo die Grenzen einer so definierten Chromatindomäne liegen. Die bislang umfangreichsten Untersuchungen zu diesem Problem wurden in der Ovalbumingen-Familie des Hühneroviduktes durchgeführt (60). Das Ovalbumingen liegt mit seinen verwandten Genen X und Y, mit denen es in gewebsspezifischer und hormoninduzierbarer Weise koordiniert reguliert wird, in einer 100 Kb umfassenden Domäne. Der nuklease-sensitive Zustand wird nur im Oviduktgewebe von Legehennen beobachtet, jedoch nicht in Milz-, Leber- oder Erythrozytenkernen, in denen die Gene inaktiv sind. Nach Hormonentzug und damit verbundenem Rückgang der Transkription, bleibt die DNAaseI-sensitive Domäne im Ovidukt bestehen. Die aufgelockerte Konformation des Chromatins ist also nicht an die aktuell stattfindende Transkription gebunden, sondern spiegelt deren Potential dafür wieder.

Das Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-Gen (GAPDH-Gen), welches ebenfalls von der Arbeitsgruppe von O'Malley untersucht wurde, wird in allen Geweben konstitutiv exprimiert und befindet sich dort in einer sich nur über 12 Kb erstreckenden DNAaseI-sensitiven Domäne (68).

Die β -Globingenfamilie befindet sich in Maus-Erythroleukämie-Zellen in zwei unterschiedlichen Domänen, die sich in ihrer DNAaseI-Sensitivität unterscheiden. Jeweils das funktionell aktive Gen befindet sich in einer sensitiven Domäne (113).

Das Lysozymgen liegt im Hühnerovidukt in einer sensitiven Konformation vor, wogegen es in der Leber und in Erythrozyten, in denen es nicht transkribiert wird, relativ unempfindlich gegenüber DNAase I ist. Die Größe der Lysozymgendomäne umfaßt 24 Kb und ist somit größer als die entsprechende Domäne des GAPDH-Gens, während die Länge der codierenden Regionen beider Gene in etwa übereinstimmen. Jedoch unterliegt das GAPDH-Gen keinen komplexen Regulationsmechanismen wie das Lysozymgen. Dies könnte für die unterschiedliche Größe beider Domänen verantwortlich sein.

Die 3'-Grenze der Lysozymdomäne wurde mit einer Unsicherheit von 4 Kb bestimmt. Eine genauere Lokalisierung wurde durch die repetitive DNA zwischen den Proben G und H verhindert. Der Übergang von der sensitiven zur resistenten Struktur erfolgt am 5'-Ende allmählich. Der Übergangsbereich erstreckt sich über 6-7 Kb. Eine ähnliche Situation wurde auch am 5'-Ende der Ovalbumin- und GAPDH-Gen-Domäne gefunden.

Die molekularen Grundlagen der allgemeinen Sensitivität aktiver Gene und der allmähliche Rückgang dieser Sensitivität an der 5'-Grenze aktiver Domänen sind bislang nicht vollständig verstanden. Eine Reihe von möglichen Erklärungen ist denkbar. Die Ursachen der DNAase I-Sensitivität wurden einer veränderten Nukleosomen-Kernpartikelstruktur zugeschrieben. Für die Induktion der sensitiven Nukleosomenkonfiguration wurden HMG-Proteine (114), veränderte Histonzusammensetzungen (115) und Histonmodifikationen (116) verantwortlich gemacht. Eine allmähliche Veränderung des Verhältnisses von modifizierten und nicht modifizierten Nukleosomen entlang der Chromatinfiber, möglicherweise als Konsequenz eines unterschiedlichen Torsionsstress (19), könnte die allmähliche Änderung der DNAase I-Sensitivität erklären. Ferner wurde die verstärkte DNAase I-Sensitivität dem Entwinden der Solenoid-Strukturen zugeschrieben (113, 117). Vorausgesetzt, die Spiralisierung des Chromatin-Filamentes startet in einer Population von Zellen an verschiedenen Punkten entlang der DNA, so könnte eine allmähliche Änderung der DNAase I-Sensitivität auch auf Grund dieser Annahme erklärt werden.

Innerhalb der sensitiven Domäne des Lysozymgens liegen, bis auf eine Ausnahme, sämtliche hypersensitiven Stellen "geclustert". Diese Beobachtung stellt eine Verbindung zwischen der Domäne und funktionellen Gesichtspunkten des Lysozymgens her. Die DNAaseI-sensitive Domäne könnte die strukturelle und funktionelle Einheit eines eukaryontischen Gens definieren, in welcher alle für das Gen notwendigen Regulationsstrukturen enthalten sind.

3.2.2. Nukleotidsequenz an der 3'-Domänengrenze

Um einen besseren Einblick in die Struktur des Übergangsbereiches am 3'-Ende der Lysozymgendomäne zu bekommen, wurden dort Sequenzuntersuchungen vorgenommen. In dem sequenzierten Bereich trat der Vertreter einer Gruppe von mittelrepetitiven Sequenzelementen auf, die bei Hühnern als CRI-Familie (chicken repetitive element 1) zusammengefaßt werden (74). O'Malley und Mitarbeiter vermuteten, daß diese repetitiven Elemente möglicherweise bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Domäne eine wichtige Rolle spielen. Bisher war die Sequenz von 7 CRI-Elementen bekannt. Drei weitere CRI-Elemente konnten im Rahmen dieser Arbeit innerhalb der Lysozymgen-Domäne charakterisiert werden. Ein CRI-Element des Lysozymgens korreliert mit der 3'-Grenze der Domäne, die beiden anderen liegen 1,2 bzw. 5,3 Kb vor der Transkriptionsstartstelle und stimmen bei dieser Lage in keiner Weise mit der 5'-Domänengrenze überein.

Während beim Ovalbumingen CRI-Elemente ausschließlich an den Domänengrenze auftreten (74), konnten in der GAPDH-Gendomäne des Huhns keine CRI-Elemente gefunden werden (68). Auch die Analyse des humanen $\alpha 1(I)$ -Kollagengens ergab keine Anhäufung von repetitiven Sequenzen, ähnlich den CRI-Elementen bei Hühnern, in den flankierenden Bereichen des Gens (85).

Nicht nur der Lage, sondern auch der Orientierung der CRI-Elemente zum Gen, wurde eine Bedeutung zugewiesen. Alle bislang bekannten CRI-Elemente waren immer auf das jeweils benachbarte Gen gerichtet (76). Die CRI-Elemente des Lysozyngens widersprechen dieser Regel, da sie vom Gen weg orientiert sind.

Die hier beschriebenen Ergebnisse am Lysozynggen, sowie die anderen diskutierten Arbeiten, deuten darauf, daß repetitive Elemente im allgemeinen, und CRI-Elemente im besonderen, doch nicht die Rolle bei der Bildung von Domänen spielen, wie ihnen früher zugeschrieben wurde (74,76).

Durch die Bestimmung weiterer Vertreter der CRI-Familie war ein ausgedehnter Sequenzvergleich der am stärksten konservierten Region, die 40 Bp umfaßt, möglich. Ein aus dem Homogenat des hormonstimulierten Hühnerovidukts gereinigtes Protein bindet spezifisch an diese hoch konservierte 40 Bp-Sequenz (78). Da der restliche Anteil dieser mittelrepetitiven Elemente sehr divergent ist, und auch andere Befunde für eine lange evolutionäre Persistenz im Hühnergenom sprechen (76), ist diesem konservierten Bereich eine noch unbekannte Funktion zuzuschreiben. Interessanterweise befindet sich eines von den drei CRI-Elementen entweder innerhalb der hypersensitiven Stelle HS +7,9 oder sehr nahe daran. Es ist nicht klar, ob die Bindung eines spezifischen Nüchthistonproteins an diese Sequenz die Hypersensitivität der Region bewirkt. Dann bliebe nämlich unklar, warum die Bindung an die beiden anderen CRI-Elemente nicht auch zu hypersensitiven Strukturen führen. Es ist umgekehrt vorstellbar, daß CRI-Elemente eine Funktion haben, die jedoch nur dann ausgeprägt ist, wenn diese Elemente in hypersensitiven Chromatinstrukturen vorliegen. Eine parallele Situation existiert bei den Glucocorticoid-Konsensussequenzen. Im Falle des Tyrosin-Aminotransferase-Gens der Ratte konnte die Arbeitsgruppe von G. Schütz durch Deletionsmutationen zeigen, daß nur jene Konsensussequenzen funktionell sind, die im aktiven Gewebe in einer hypersensitiven Chromatinstruktur vorliegen (G. Schütz, persönliche Mitteilung). Die anderen im Genbereich vorkommenden Konsensussequenzen scheinen funktionell bedeutungslos zu sein.

In früheren Arbeiten wurden Indizien für einen retroviralen Ursprung der CR1-Elemente diskutiert (76). Durch Sequenzvergleiche konnte in der vorliegenden Arbeit auch eine starke Homologie zu einem Teil des Genoms des humanen Papillomavirus AI (118) aufgezeigt werden, was ein weiterer Hinweis für die virale Herkunft der CR1-Elemente ist.

3.2.3. Zusammenhang zwischen DNAaseI-sensitiven Domänen und Domänen, die als Bereiche zwischen zwei Matrixanheftungsstellen definiert sind

Aktiv transkribierte Gene scheinen einem Torsionsstress zu unterliegen. Zur Entfaltung dieser Spannung muß das Chromatin-Filament in bestimmten Abständen an tragende Strukturen des Kerns (Matrix, scaffold, envelope etc.) angeheftet sein. Die Arbeitsgruppe von Laemmli charakterisierte mit Hilfe einer besonderen Extraktionsmethode Matrixanheftungsstellen bei verschiedenen Drosophila-Genen (42,43,77). Eine Domäne wird in diesem Fall durch den Abstand zweier Matrixanheftungsstellen (SAR's, scaffold-attachment-regions) definiert. Eine Anhäufung von Sequenzelementen, wie sie für SAR's charakteristisch sind, konnte im 3'-Grenzbereich der Lysozymgen-Domäne nicht gefunden werden. Da SAR-Sequenzen bislang fast ausschließlich bei Drosophila melanogaster charakterisiert wurden, besteht die Möglichkeit, daß bei Vertebraten andere Sequenzmotive im Bereich von Matrixanheftungsstellen vorliegen. Es bleibt nach wie vor unklar, welche Beziehung zwischen dieser Art von Domäne und der durch die DNAaseI definierten Domänen besteht, d.h. es ist noch nicht bekannt, ob die Grenzen von DNAaseI-sensitiven Domänen mit Matrixanheftungsstellen übereinstimmen.

3.3. Die hypersensitive Stelle HS +3,9 des Lysozymgens

Gemeinsames Merkmal von hypersensitiven Regionen in der Chromatinstruktur ist ihre erhöhte Zugänglichkeit für Nukleasen und andere DNA-spaltende Reagenzien. Es bestehen jedoch Unterschiede

in der Art ihrer Etablierung. Hypersensitive Stellen, die in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand der Zelle ausgebildet werden, bedingen Veränderungen der Chromatinstruktur in diesem Bereich, möglicherweise als Voraussetzung oder als Folge der Bindung spezifischer Proteine. Andererseits existieren "konstitutive" hypersensitive Stellen, die meistens 3' der Gene liegen und unabhängig vom Aktivitätszustand in allen Geweben eines Organismus ausgebildet werden. Wie im Ergebnisteil schon angedeutet, werden drei Möglichkeiten für die Ausbildung hypersensitiver Stellen in Erwägung gezogen (22):

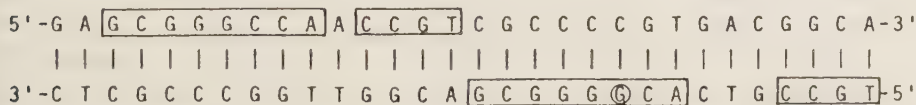
1. Stabile DNA-Nichthistonprotein-Komplexe, die von Generation zu Generation weitergegeben werden, verhindern die Anlagerung von Nukleosomen an solchen Stellen.
2. Gewebsspezifisches Auftreten eines Faktors (z.B. Hormonrezeptor-Komplex) verdrängt kompetitiv ein Nukleosom von einer spezifischen DNA-Sequenz.
3. Die DNA-Sequenz ist so, daß sie nur schwer oder gar nicht um Histonoktamere gewickelt werden kann.

HS +3,9 des Lysozymgens scheint in die dritte Gruppe zu gehören. Nach Transformation von Hefezellen mit einem Hefepiasmid konnte gezeigt werden, daß diese Sequenzen auch in Hefe frei von Nukleosomen bleiben, während der übrige Teil des Plasmids regulär in Nukleosomen verpackt wird. Dies ist ein guter Hinweis dafür, wenn auch kein strenger Beweis, daß diese Sequenzen Eigenschaften besitzen, die sie nicht in Nukleosomen verpacken läßt. Die zusätzliche Beteiligung von spezifischen Nichthistonproteinen ist sogar wahrscheinlich, denn diese hypersensitive Stelle zeigt eine größere Ausdehnung im aktiven Ovidukt als in inaktiven Zellen (44). Interessanterweise ist die Ausdehnung in Hefe noch erheblich größer. Dies deutet in der Hefe auf eine Interferenz der hypersensitiven Sequenz mit der Nukleosomen-Positionierung im 5' angrenzenden Bereich. Möglicherweise ist diese Stelle in allen Geweben von vornherein zugänglich, jedoch scheinen zumindest im Ovidukt gewebsspezifische Proteinfaktoren dort zu binden und ihre Feinstruktur zu verändern.

Die induzierbaren hypersensitiven Stellen 5' des Lysozymgens benötigen natürlicherweise für ihre Ausbildung spezies- und gewebespezifische Faktoren. Deswegen wurden auch 5'-seitige DNA-Sequenzen des Lysozymgens als Kontrollen in Hefe transformiert. Diese Sequenzen wurden in der Hefe in Nukleosomen verpackt, ohne hypersensitive Stellen auszubilden, im Einklang mit der Annahme, daß in der Hefezelle die entsprechenden spezifischen Nihthistonproteine nicht vorhanden sind.

Die Nukleotid-Sequenz, die der hypersensitiven Stelle HS +3,9 zu Grunde liegt, ist ungewöhnlich. Da sie einen sehr hohen GC-Gehalt aufweist (87% auf 180 Bp), besitzt sie eine DNA-Feinstruktur, in der normalerweise die DNAaseI nur mit verminderter Effizienz spaltet (119). (Die Breite der kleinen Furche, in welcher die DNAaseI bindet, ist in GC-reichen Sequenzen vergrößert).

Innerhalb des hypersensitiven Bereichs treten interessante Sequenzmerkmale auf. Zum einen findet man eine Stamm- und Schleifenstruktur. Der Stamm besteht ausschließlich aus G- und C-Nukleotiden. Die Schleife ist gekennzeichnet durch das Vorkommen einer ungewöhnlichen Sequenz:



Wie man sieht wiederholen sich die eingerahmten Sequenzelemente des oberen Strangs mit umgekehrter Polarität im unteren Strang. Möglicherweise läßt sich die in Abb.21 gezeigte "Doppelschleife", jedoch nicht mit normalen Watson-Crick-Basenpaarungen, konstruieren. Die Bildung von Bäumchenstrukturen, allerdings auf RNA-Ebene, haben bei anderen Genen funktionelle Bedeutung bei der Transkriptionsterminierung und dem RNA-Prozessieren (120). Eine solche Funktion kann auch hier nicht ausgeschlossen werden.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

a. Versuchstiere

Hühner: White Leghorn (LSL), Gut Heinrichsruh, München

Kaninchen: New Zealand, Behring-Werke, Marburg

b. Enzyme:

DNA-Polymerase I, Polynukleotid-Kinase, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, T4-DNA-Ligase, Restriktionsnukleasen: Boehringer, Mannheim

DNAase I: Worthington

Proteinase K: Merck, Darmstadt

Ribonuklease A: Sigma, München

Lysozym: Serva, Heidelberg

Zymolyase: Seikagatin Kogyo Co., Tokyo, Japan

c. Radioaktivität

(α - 32 P) dATP

(α - 32 P) dCTP

(γ - 32 P) ATP: New England Nuclear (NEN), Dreieich

d. Antibiotika

Ampizillin (Binotal): Bayer, Leverkusen

Tetracyclin (Achromycin): Cyanamid, Wolfratshausen

Chloramphenicol: Boehringer, Mannheim

e. Chemikalien

Grundchemikalien, Ethidiumbromid, Natriumdodecylsulfat (SDS), Polyethylenglykol 6000, Hefeextrakt, Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), EDTA (Titriplex III), EGTA (Titriplex IV), Bromphenolblau, β -Mercaptoethanol, Piperidin, Dimethylsulfat (DMS): Merck, Darmstadt

Xylencyanol FF, Acrylamid, N, N, N', N'-Tetraethylendiamin (TEMED), Dithioerythrol, DNA aus Lachsspermien, Hydrazin: Serva, Heidelberg

Desoxyribonukleotidtriphosphate, Didesoxynukleotidtriphosphate, t-RNA aus Bierhefe: Boehringer Mannheim

Spermin, Spermidin: Fluka, Neu-Ulm

Bacto-Agar, Bacto-Tryptone: Difco, Detroit, USA

Ficoll 400, Sephadex G-50, Poly(U)-Sephadex: Pharmacia, Uppsala, Schweden

Rinderserumalbumin (BSA), Polyvinylpyrrolidon, Triton X-100, Dimethylarsensäure (Cacodylsäure): Sigma, München

N,N'-Dimethylenbisacrylamid, Caesiumchlorid, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoloyl- β -D-Galaktosid (X-Gal): Biomol, Ilvesheim

Mischbettionenaustauscher AG 501-X8: Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA

Ammoniumpersulfat: BRL, Sea Kem Agarose, Sea Plaque Agarose: Marine Colloids, Rockland, USA

Dimethyldichlorsilan: BDH Chemicals Ltd., Pool, England

f. Bakterien - und Hefestämme

E.coli JM103 wurde von H.-P. Fritton, München zur Verfügung gestellt.

Der Hefestamm (*Sacharomyes cerevisiae*, DBY747a, his 3- δ , leu 2-3, leu 2-112, ura 3-52, trp 1) wurde von J. Hauber, München, zur Verfügung gestellt

g. DNA-Klone

Die Lysozymgenklone, die bei der Untersuchung der Allgemeinen DNAase I-Sensitivität eingesetzt wurden, stammen von H.-P. Fritton und sind in Referenz (44) genau beschrieben.

Der Klon ZH 30 (BamHI-EcoRI-Fragment des Plasmids pBR 322 in M13) wurde freundlicherweise von W. Hörz, München, zur Verfügung gestellt.

h. Sonstiges

Nitrozellulose-Filter, BA 85, Schleicher und Schüll, Dassel
"Gene Screen Plus" Hybridisierungsmembran: New England Nuclear (NEN), Dreieich

M13 Einzelstrangprimer (17 Bp); P.L. Biochemicals, Ulmenhof

M13 mp 7, 8, 9, 10, 11: P.L. Biochemicals, Milwaukee, USA

Gene Screen Plus: NEN Research Products, Boston, USA

RX-Röntgenfilme: Fuji Photo Co., Tokyo, Japan

Verstärkerfolien: Curix MR 600, Agfa-Gevaert, Leverkusen

4.2. Methoden

4.2.1. Hormonbehandlung der Kaninchen

Die Injektion der Steroide (in Sesamöl) erfolgte intramuskulär bzw. subkutan.

Östrogenbehandlung: Östradiol-17 β (100 μ g), 2 Tage

Östrogen- und Progesteronbehandlung: Östradiol-17 β (100 μ g), 2 Tage, anschließend Progesteron (5 mg), 4 Tage

Glucocorticoidbehandlung: Dexamethason (10 mg) bzw.

Cortisolacetat (20 mg), 5 Tage.

Es erfolgte eine Injektion täglich. Die Tiere wurden jeweils 24 h nach der letzten Injektion getötet. Diese Hormonbehandlung wurde von der Arbeitsgruppe Beato durchgeführt.

4.2.2. Isolierung von Zellkernen

4.2.2.1. Isolierung von Zellkernen aus Endometrium, Leber, und Lunge von Kontrolltieren und hormonbehandelten Kaninchen sowie aus Ovidukt, Leber und Erythrocyten von Legehennen

Die Gewebe wurden zunächst in SSTKNaEE* (0,5mM Spermin, 0,15mM Spermidin, 60mM KCl, 15mM NaCl, 2mM EDTA, 0,5mM EGTA, 15mM Tris-HCl, pH 7,4)-0,5M Saccharose-1mM PMSF mit Hilfe eines Potters

homogenisiert. Anschließend wurden die Zellkerne bei 2000xg 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann solange in SSTKNaEE*-0,5M Sacharose-1mMPMSF-0,5% Triton X-100 gewaschen, bis die Zellkerne farblos waren. Um das Triton X-100 aus der Präparation zu entfernen folgten zwei weitere Waschgänge in SSTKNaEE*-0,35M Sacharose-1mM PMSF. Die gesamte Prozedur wurde bei 4°C durchgeführt. Isolierte Zellkerne wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.2.2. Isolierung von Hefezellkernen

Die Hefezellen aus 500ml-Kulturen wurden abzentrifugiert (1000xg), einmal mit bidest. Wasser gewaschen und in SSTKNaEE*-1M Sorbit- 1mM PMSF-10mM β -Mercaptoethanol (5 ml pro Gramm Naßgewicht) aufgenommen. Dann erfolgte die Zugabe von Zymolyase 100T (2 mg pro Gramm Naßgewicht). Die Hefezellen wurden bei 30°C leicht geschüttelt.

Die Zerstörung der Hefezellwände wurde durch Messung der optischen Dichte verfolgt.

Nach Abnahme der optischen Dichte auf 10-20% wurden die Zellen in SSTKNaEE*-0,35M Sacharose-1mM PMSF-0,5% Triton X-100 lysiert. Die Zellkerne wurden bei 2000xg 10 Minuten abzentrifugiert und 2 mal in SSTKNaEE*-0,35M Sacharose-1mM PMSF gewaschen. Anschließend wurden sie aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

4.2.3. Verdau von Zellkernen mit pankreatischer DNAaseI und Isolierung genomischer DNA

Aufgetaute bzw. frisch hergestellte Zellkerne wurden in SSTKNaEE*-1mM PMSF gewaschen und anschließend in SSTKNaEE (0,5mM Spermin, 0,15mM Spermidin, 60mM KCl, 15mM NaCl, 0,2mM EDTA, 0,2mM EGTA, 15mM Tris-HCl, pH 7,4)-1mM PMSF aufgenommen (200-1000 μ g DNA/ml). Der enzymatische Verdau mit DNAaseI erfolgte in einem Konzentra-

tionsbereich von 0-4096 U/ml für 10 bis 15 Minuten bei 0°C. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 5mM $MgCl_2$. Durch Zugabe von 12,5mM EDTA wurde die Reaktion gestoppt.

Die Kerne wurden in SSTKNaEE* gewaschen und dann mit 250 µg/ml Proteinase K in 0,1% SDS-2mM EDTA-50mM Tris-HCl (pH8,0) für 4 Stunden bei 37°C behandelt.

Nach dreimaliger Ethanol-fällung wurde die RNA in 50mM Tris-HCl-50mM Natriumacetat (pH7,0) mit 50 µg/ml RNAase A entfernt.

Bei Verwendung von Hefezellkernen wurde statt der dreimaligen Ethanol-fällung eine Deproteinisierung mit Phenol/Chloroform durchgeführt. Nach einer weiteren Ethanol-fällung wurde die DNA in 1mM EDTA-10mM Tris-HCl (pH7,4) gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

4.2.4. Analyse der DNAaseI-hypersensitiven Stellen

Die DNA aus den DNAaseI-behandelten Kernen wurde mit einem geeigneten Restriktionsenzym in SSTKNaEE*-7mM $MgCl_2$ nachgespalten (2-4 U/µg DNA). Die Elektrophorese der nachgespaltenen DNA - Fragmente erfolgte auf 6 mm dicken, vertikalen 1,2%igen Agarosegelen in einem Tris-Acetat-Puffer (121). Der Transfer der DNA auf Nitrozellulose oder Gene Screen Plus erfolgte nach der Methode von Southern (122). Die Hybridisierungsproben für die indirekte Endmarkierung wurden durch Nick-Translation radioaktiv markiert (123).

Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen sind in Referenz (130) angegeben. Die Exposition der Filter erfolgte bei -80°C.

4.2.5. Analyse der allgemeinen DNAaseI-Sensitivität

Die DNA aus DNAaseI-Verdauen wurde ohne Nachspaltung in 0,3M NaOH bei 65°C 30 bis 60 Minuten lang denaturiert. Durch die Zugabe von einem Volumenanteil 2M Ammoniumacetat (pH7,0) wurde die Lösung neutralisiert. Jeweils 5 µg Gesamt-DNA eines jeden DNAaseI

Kinetik-Wertes wurden mit Hilfe der Slot-Blot-Technik auf Nitrozellulosefilter aufgezogen. Die Hybridisierung der Filter erfolgte wie unter 4.2.4. beschrieben.

Die Autoradiogramme der Hybridisierungsfiler wurden mit Hilfe eines Gilford-Scanners im sichtbaren Bereich quantitativ ausgewertet.

4.2.6. Isolierung von mRNA aus Hühnerovidukt

Cytoplasmatische Gesamt-RNA aus Hühnerovidukt wurde sofort nach dem Töten der Tiere gewonnen. Ungefähr 2 Gramm Oviduktgewebe wurden in 3M LiCl-6M Harnstoff-300mM NaAc (pH 6,0) (10 ml/g) 6x30 Sekunden mit einem Waring blender homogenisiert und über Nacht bei 0°C gehalten. Das Präzipitat wurde 20 Minuten bei 15.000xg abzentrifugiert.

Das Pellet wurde in 20 ml phenolgesättigtem 50mM Natriumacetat (pH 5,5)-10mM EDTA-0,5% SDS gelöst, zweimal mit Phenol, einmal mit Phenol-Chloroform (1:1) und zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1/10 Volumen 5M NH₄-Acetat und dem 2,5fachen Volumen Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt.

Die RNA wurde dann in 1-2ml Elutionspuffer (10mM Tris-HCl (pH 7,5), 1mM EDTA, 0,2% SDS) gelöst und 5 Minuten auf 65°C erhitzt. Die Lösung wurde anschließend auf 0,5M NaCl eingestellt und auf eine Poly(U)-Sephrose-Säule gegeben. Das Eluat wurde 2 weitere Male auf die Säule aufgetragen.

Poly(A)⁻-RNA wurde mit 20 - 30 ml Bindungspuffer (10mM Tris-HCl (pH 7,5)-1mM EDTA-0,2% SDS-0,5M NaCl) von der Säule eluiert.

Poly(A)⁺-RNA wurde mit 10 ml Elutionspuffer bei 38 °C von der Säule gewonnen.

Die mRNA wurde mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol gefällt, getrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

4.2.7. 5'-Endmarkierung von mRNA

Die RNA wurde mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, mit Polynukleotidkinase und γ - ^{32}P -ATP endmarkiert (124).

Die Hybridisierung von Slot-Blot-Filtern erfolgte 18 Stunden bei 68°C in 4xSSC, 0,5% SDS und 1 $\mu\text{g/ml}$ ^{32}P -markierter RNA.

Nach der Hybridisierung wurden die Filter 3 mal eine halbe Stunde bei 60°C in 3xSSC gewaschen. Anschließend wurden die Filter mit 20 $\mu\text{g/ml}$ RNAase A, 30 Minuten bei 37°C in 2xSSC, behandelt.

4.2.8. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Strang-Abbruchmethode (125) oder nach der chemischen Sequenziermethode (126).

Rekombinante M13 mp7, mp9, mp10 und mp11-Phagen wurden mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme konstruiert.

Die DNA-Sequenzen wurden mit einem MINC 23-RT11-Computersystem unter Zuhilfenahme der Programme von R. Staden (127) und P. Neumaier (128) analysiert.

4.2.9. Rekombinante-DNA-Techniken

Klonierungen in pBR322 und M13, Gelelektrophoresen und andere nicht aufgeführte Methoden wurden gemäß Referenz (129) ausgeführt.

5. Zusammenfassung

Die letzten Jahre brachten vermehrt Hinweise dafür, daß mit der Aktivierung eines eukaryontischen Gens Veränderungen der Chromatinstruktur einhergehen. Es läßt sich eine Auflockerung der Chromatinstruktur im Genbereich feststellen, die zu einer erhöhten DNAaseI-Sensitivität führt. Gleichzeitig werden in den flankierenden Bereichen des Gens einzelne Nukleosomen durch Nicht-histonproteine ersetzt. Dies führt zu einer noch wesentlich höheren Sensitivität dieser kurzen, ca. 200-400 Bp umfassenden, Bereiche, den sogenannten DNAaseI-hypersensitiven Stellen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden im wesentlichen zwei Ziele verfolgt:

(1) Gibt es eine Korrelation zwischen DNAaseI-hypersensitiven Stellen in der Chromatinstruktur und cis-wirkenden, regulatorischen DNA-Elementen wie Promotoren, Enhancern und Steroid-Rezeptor-Bindungsstellen?

(2) Wie weit reicht die aufgelockerte Chromatinstruktur in die 5'- und 3'-flankierende Region des aktivierten Gens?

Erstreckt sie sich entlang einer ganzen Chromatinschleife (Domäne), die man als strukturelle Einheiten in Metaphase- und Lampenbürstenchromosomen nachgewiesen hat?

Die genannten Fragen wurden am Beispiel von zwei Genen, dem Uteroglobingen des Kaninchens und dem Lysozymgen des Huhns untersucht. Beide Gene werden im wesentlichen in je zwei verschiedenen Geweben dieser Tiere exprimiert, wobei ihre Expression jeweils unterschiedlich reguliert wird. Das Lysozymgen wird im Eileiter hormonell kontrolliert, in Makrophagen dagegen konstitutiv exprimiert. Die Transkription des Uteroglobingens wird im Endometrium durch Progestine stark stimuliert, in der Lunge dagegen durch Glucocorticoide.

Zunächst konzentrierten sich die Untersuchungen am Uteroglobingene auf die Lage von DNAaseI-hypersensitiven Stellen im Endometrium und in der Lunge, sowie, zum Vergleich, in der inaktiven Leber. Im Endometrium wurden vier DNAaseI-hypersensitive Stellen gefunden: drei oberhalb des Gens und eine unterhalb. Die drei hypersensitiven Stellen vor dem Gen sind streng gewebsspezifisch: eine überlappt teilweise mit dem Promotor und zwei korrelieren mit weit entfernt vom Gen liegenden Progesteron-Rezeptor-Bindungsstellen. Diese Regionen liegen nur bei hohem Progesteronspiegel der Tiere in einer hypersensitiven Konformation vor. In in-vivo-Experimenten läßt sich durch Hormongabe und durch Hormonentzug die Hypersensitivität dieser Stellen, parallel zur Transkriptionsaktivität, steigern und unterdrücken. Aus Untersuchungen der Arbeitsgruppen Beato und Milgrom wurde kürzlich bekannt, daß in der 5'-flankierenden Region des Gens sieben Progesteron-Rezeptor-Bindungsstellen vorhanden sind. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, daß nur vier dieser Stellen in einer hypersensitiven Konformation vorliegen und daher wahrscheinlich funktionell sind. Der Mechanismus, wie sich diese drei Regionen gegenseitig beeinflussen und letztlich zur Transkriptionsaktivierung führen, bleibt jedoch ungeklärt.

Einige der hypersensitiven Stellen zeigen interessante Merkmale. Die Feinkartierung der im Promotorbereich liegenden Stelle ergab, daß sie nicht den gesamten Promotor umfaßt. Die sogenannte CAAT-Box liegt innerhalb der hypersensitiven Region, die TATA-Box und die Transkriptionsstartstelle bereits außerhalb. Die beiden anderen hypersensitiven Stellen befinden sich in relativ großer Entfernung vom Gen (-2,4 und -3,7 Kb). Da im Promotorbereich selbst keine Progesteron-Rezeptor-Bindungsstellen gefunden wurden, muß angenommen werden, daß die hormonelle Regulation der Transkription im Falle des Uteroglobingens aus dieser großen Entfernung erfolgt.

Die hypersensitive Stelle HS -2,4 zeigt eine bemerkenswerte Nukleotidsequenz. Sie besteht aus 20 leicht divergenten Oktanukleotid-Motiven, die die Progesteron-Rezeptor-Bindungsstelle mit einschließen. Diese Boxen könnten Bindungsstellen für ein nicht

identifiziertes Protein darstellen oder der DNA Eigenschaften verleihen, die es ihr erleichtern, alternative Strukturen anzunehmen. Die mögliche Rolle der Umwandlung von DNA-Abschnitten in alternative Formen (Z-DNA etc.) wird zur Zeit intensiv diskutiert.

Die hypersensitive Stelle 3' vom Gen (HS +4,1) kommt auch in inaktiven Geweben vor und ist unabhängig vom Hormonspiegel des Tieres. Die funktionelle Bedeutung dieser Stelle im besonderen, sowie gewebsunspezifischer hypersensitiver Stellen im allgemeinen ist unklar. Eine Rolle bei der Transkriptionsterminierung wird diskutiert.

In der Lunge wurden ebenfalls hypersensitive Stellen erwartet, die mit dem Promotor und den bekannten Glucocorticoid-Rezeptor-Bindungsstellen übereinstimmen sollten. Die Tatsache, daß derartige Stellen vor dem Gen nicht nachgewiesen werden konnten, läßt sich dadurch erklären, daß nur ein geringer Anteil der Zellen im Lungengewebe Uteroglobine produziert. Dieser Umstand führte letztlich dazu, daß die Konzepte nicht im ursprünglich vorgesehenen Ausmaß durchgeführt wurden. Es erschien sinnvoller, offene Fragen, wie etwa die Ausdehnung der Chromatindomäne am Lysozymgen statt am Uteroglobingen zu verfolgen.

Über das Lysozymgen war aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mehr bekannt als über das Uteroglobingen. Unter anderem sind die hypersensitiven Stellen in den aktiven und inaktiven Geweben bereits kartiert worden. Es stellte sich die Frage, ob alle - auch die im Abstand von 8 Kb liegenden - in einer funktionellen Beziehung zum Lysozymgen stehen. Durch die genaue Bestimmung der Ausdehnung der DNAaseI-sensitiven Domäne und durch die Lokalisierung der Grenzen der Domäne, an denen die Chromatinstruktur wieder in eine resistente Konformation übergeht, konnte diese Frage klar beantwortet werden. Alle hypersensitiven Stellen bis auf eine, die weit hinter dem Gen liegt, sind innerhalb der sensitiven Domäne, die eine Länge von 24 Kb hat. Diese Länge entspricht der durchschnittlichen Größe von Chromatinschleifen.

Der genaue Mechanismus der Auflockerung einer Chromatinschleife und damit verbunden die Etablierung eines potentiell aktiven Zustands eines Gens, ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

An den Domänengrenzen ist die Chromatinschleife mit tragenden Strukturen des Zellkerns (Matrix, Scaffold) fest verankert. Befunde von Laemmli und anderen Arbeitsgruppen deuten darauf hin, daß an dieser Verankerung Topoisomerase II bzw. CRI-Elemente beteiligt sind. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen zeigen keine Anhäufung von Topoisomerase II-Bindungsstellen im Grenzbereich der Domäne. Auch die Lage der gefundenen CRI-Elemente läßt keinen klaren Schluß über ihre Beteiligung an der Verankerung der Domäne zu.

Während über die mögliche Funktion der meisten hypersensitiven Stellen um das Lysozymgen aus früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe einiges bekannt war, blieb die Rolle der Stelle unmittelbar hinter dem Gen im Dunkeln. Die durchgeführten Sequenzanalysen lieferten eine ungewöhnliche DNA-Sequenz mit langen Guanosin- und Cytidinfolgen. Die Sequenz läßt sich auch zu einer "Bäumchenstruktur" falten, was für eine Beteiligung an der Transkriptionsterminierung oder der RNA-Prozessierung spricht. Dieser DNA-Abschnitt liegt in allen Geweben des Huhns - und nach Transfer in Hefezellen auch hier - in einer hypersensitiven Chromatinkonformation vor. Es spricht einiges dafür, daß diese Sequenz die Eigenschaft besitzt, sich nicht in eine stabile Chromatinstruktur (Nukleosom) verpacken zu lassen. Es kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden, daß für die Hypersensitivität dieser Sequenz ein universell, auch in der Hefe vorkommendes Protein verantwortlich ist. Bisher sind in der Literatur keine natürlich vorkommenden Sequenzen beschrieben, die sich nicht in Nukleosomen verpacken lassen.

Die moderne Molekularbiologie brachte in den letzten Jahren eine Fülle von Informationen über die Regulation eukaryontischer Gene. Vergleiche von DNA-Sequenzen aus Datenbanken ermöglichen die Entdeckung diverser konservierter Sequenzmotive (Enhancer-core, Hormon-Rezeptor-Bindungsstellen und Bindungssequenzen anderer Trans-

kriptionsfaktoren etc.) in den Flanken eines jeden Gens. Welche dieser potentiellen Regulationssequenzen jedoch funktionell relevant sind, läßt sich in den meisten Fällen aus Untersuchungen der Chromatinstruktur vorhersagen. Es ist eine Regel, daß solche Sequenzen in zugänglichen und somit hypersensitiven Regionen vorliegen müssen. Durch die Bestimmung solcher Bereiche um das Uteroglobins- und Lysozymgen liefert diese Arbeit wichtige Voraussetzungen für eine gezielte Klärung der Funktion einzelner regulatorischer DNA-Elemente.

7. Literaturverzeichnis

1. Nierlich, D.P. (1978) *Annu. Rev. Microbiol.* **32**, 393-432
2. Anderson, J.N., (1985) In: *Biological Regulation and Development Vol. 3B, Hormone Action*, Goldberger, R.F., Yamamoto, K.R. (eds.), 169-212, Plenum Press, New York
3. Beato, M., Arnemann, J., Menne, C., Müller, H., Suske, G. and Wenz, M. (1983) In: *Regulation of Gene Expression by Hormones*, Mc Kerns, K.W. (eds.), 151-175, Plenum Press, New York
4. Müller, H. and Beato, M. (1980) *Eur. J. Biochem.* **112**, 235-241
5. Lombardero, M. and Nieto, A. (1981) *Biochem. J.* **200**, 487-494
6. Hynes, N.E., Groner, B., Sippel, A.E., Nguyen-Huu, M.C. and Schütz, G. (1977) *Cell* **11**, 923-932
7. Schütz, G., Nguyen-Huu, M.C., Giesecke, K., Hynes, N.E., Groner, B., Wurtz, T. and Sippel, A.E. (1978) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **42**, 617-624
8. Hauser, H., Graf, T., Geiser-Wilke, J., Lindenmaier, W., Grez, M., Land, H., Giesecke, K. and Schütz, G. (1981) In: *Haematology and Blood Transfusion Vol. 26, Modern Trends in Human Leukemia 4*, Neth, R., Gallo, R.C., Graf, T., Mannweiler, K., Winkler, K. (eds.), 175-178, Springer Verlag, Heidelberg-Berlin

9. Nieto, A. and Beato, M. (1980) *Mol. Cell. Endocrinol.* **17**, 25-39
10. Roblero, L. (1973) *J. Reprod. Fertil.* **35**, 153-158
11. Voss, S.D., Schlokot, U. and Gruss, P. (1986) *Trends in Biochem. Sci.* **11**, 287-289
12. Laimius, L., Holmgren-König, M. and Khoury, G. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **83**, 3151-3155
13. Brand, A., Breedan, L., Abraham, J., Sternglanz, R. and Nasmyth, K. (1985) *Cell* **41**, 41-48
14. Ohlsson, H. and Edlund, T. (1986) *Cell* **45**, 35-44
15. Hennighausen, L. and Fleckenstein, B. (1986) *EMBO J.* **5**, 1367-1371
16. Dynan, W.S. and Tjian, R. (1985) *Nature* **316**, 774-778
17. Rich, A., Nordheim, A. and Wang, A.H.-J. (1984) *Ann. Rev. Biochemistry* **53**, 791-846
18. Cartwright, I.L., Abmayr, S.M., Fleischmann, G., Lowenhaupt, K., Elgin, S.C.R., Keene, M.A. and Howard, G.C. (1982) *CRC Crit. Rev. Biochemistry* **13**, 1-86
19. Villeponteau, B., Lundell, M. and Martinson, H. (1984) *Cell* **39**, 469-478
20. Mandel, J.L. and Chambon, P. (1979) *Nucl. Acids Res.* **7**, 2081-2103
21. Keshet, J., Lieman-Hurwitz, J. and Cedar, H. (1986) *Cell* **44**, 535-543

22. Eissenberg, J.C., Cartwright, J.L., Thomas, G.H. and Elgin, S.C.R. (1985) *Ann. Rev. Genet.* **19**, 485-536
23. Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushton, B., Levitt, M. and Klug, A. (1977) *Nature* **269**, 29-36
24. Finch, J.T. and Klug, A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 1897-1901
25. Zentgraf, H. and Franke, W.W. (1984) *J. Cell Biol.* **99**, 272-286
26. Long, B.H., Huang, C.-Y. and Pogo, A.O. (1979) *Cell* **18**, 1079-1090
27. Marsden, M. and Laemmli, U.K. (1979) *Cell* **17**, 849-858
28. Garel, A. and Axel, R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, (1976)
29. McGhee, J.D., Wood, W.J. Dolen, M., Engel, J.D. and Felsenfeld, G. (1981) *Cell* **27**, 45-55
30. Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A. and Hörz, W. (1986) *EMBO J.* **5**, 2689-2696
31. Borgmeyer, U., Nowock, J. and Sippel, A.E. (1984) *Nucl. Acids Res.* **12**, 4295-4311
32. Wu, C. (1984) *Nature* **311**, 81-84
33. Atger, M., Atger, P., Tiollais, P. and Milgrom, E. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 5970-5972
34. Suske, G., Wenz, M., Cato, A.C.B. and Beato, M. (1983) *Nucl. Acids Res.* **11**, 2257-2271

35. Bailly, A., Atger, M., Atger, P., Cerbon, M.A., Alizon, M., Vu Hai, M.T., Logeat, F. and Milgrom, E. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 10384-10389
36. Ahe, D. von der, Janich, S., Scheidereit, C., Renkawitz, R., Schütz, G. and Beato, M. (1985) *Nature* **313**, 706-709
37. Cato, A.C.B., Geisse, S., Wenz, M., Westphal, H.M. and Beato, M. (1984) *EMBO J.* **3**, 2771-2778
38. Fritton, H.P., Sippel, A.E. and Igo-Kemenes, T. (1983) *Nucl. Acids Res.* **11**, 3467-3485
39. Fritton, H.P., Igo-Kemenes, T., Nowock, J., Strech-Jurk, U., Theisen, M. and Sippel, A.E. (1984) *Nature* **311**, 163-165
40. Fritton, H.P., Igo-Kemenes, T., Nowock, J., Strech-Jurk, U., Theisen, M. und Sippel, A.E. (1987) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **368**, 111-119
41. Sippel, A.E., Nowock, J., Theisen, M., Borgmeyer, U., Strech-Jurk, U., Bonifer, C., Igo-Kemenes, T. and Fritton, H.P. (1986) In: *Coordinated Regulation of Gene Expression*, Clayton, R.M. and Truman, D.E.S. (eds.), 17-31, Plenum Press, New York
42. Gasser, S.M. and Laemmli, U.K. (1986) *EMBO J.* **5**, 511-518
43. Gasser, S.M. and Laemmli, U.K. (1986) *Cell* **46**, 521-530
44. Fritton, H.P., Dissertation (1985) Ludwig-Maximilians-Universität, München
45. Parker, M. (1983) *Nature* **304**, 687-688
46. Thomas, G.H., Siegfried, E., Elgin, S.C.R. (1985) In: *Chromosomal Proteins and Gene Expression*, Reeck, G., Goodwin, P., Puigdomenech (eds.), Plenum Press, New York

47. Wu, C. (1980) *Nature* **280**, 854-860
48. Burch, J.B.E. and Weintraub, H. (1983) *Cell* **33**, 65-76
49. Perez-Ortin, J., Estruch, F., Malallana, E. and Franco, L. (1986) *Mol. Gen. Genet.* **205**, 422-427
50. Serfling, E., Jasin, M. and Schaffner, W. (1985) *TIG* **1**, 224-230
51. Ahe, D. von der, Renoir, J.-M., Buchou, T., Baulieu, E.-E. and Beato, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 2817-2821
52. Zaret, K.S. and Yamamoto, K.R. (1984) *Cell* **38**, 29-38
53. Becker, P., Renkawitz, R. and Schütz, G. (1984) *EMBO J.* **3**, 2015-2020
54. Kok, K., Snipe, L., Ab, G. and Gruber, M. (1985) *Nucl. Acids Res.* **13**, 5189-5202
55. Jantzen, K., Fritton, H.P., Igo-Kemenes, T., Espel, E., Janich, S., Cato, A.C.B., Mugele, K. and Beato, M. (1987) *Nucl. Acids Res.*, im Druck
56. Weintraub, H. and Groudine, M. (1976) *Science* **193**, 848-856
57. Bellard, M., Kuo, M.T., Dretzen, G. and Chambon, P. (1980) *Nucl. Acids Res.* **8**, 2737-2750
58. Wood, W.J. and Felsenfeld, G. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7730-7736
59. Lawson, G.M., Tsai, M.-J. and O'Malley, B.W. (1980) *Biochemistry* **19**, 4403-4411

60. Lawson, G.M., Knoll, B.J., March, C.J., Woo, S.L.C., Tsai, M.-J. and O'Malley, B.W. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 1501-1507
61. Carmon, J., Csonek, K., Nudel, U., Shani, M. and Yaffe, D. (1982) *Nucl. Acids Res.* **10**, 3085-3098
62. Nahon, J.-L., Gal, A., Erdos, T. and Sala-Trepat, J.M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 5031-5035
63. McKeon, C., Pastan, I. and de Crombrughe, B. (1984) *Nucl. Acids Res.* **12**, 3491-3502
64. Smith, R.D. and Yu, J. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 4609-4615
65. Kunnath, L. and Locker, J. (1985) *Nucl. Acids Res.* **13**, 115-129
66. Coveny, J. and Woodland, H.R. (1982) *Nature* **298**, 578-580
67. Smith, R.D., Yu, J. and Seale, R.L. (1984) *Biochemistry* **23**, 2309-2314
68. Alvey, M.C., Tsai, M.-J. and O'Malley, B.W. (1984) *Biochemistry* **23**, 2309-2314
69. Mukherjee, A.B., Laki, K. and Agrawal, A.K. (1980) *Med. Hypotheses* **6**, 1043-1055
70. Pospelov, V.A., Klobeck, H.G. and Zachau, H.G. (1984) *Nucl. Acids Res.* **12**, 7007-7012
71. Durrin, L.K., Weber, J.L. and Gorski, J. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 7086-7093
72. Shefferey, M., Marks, P.A. and Rifkind, R.A. (1984) *J. Mol. Biol.* **172**, 417-436

73. Balcarek, J.M. and McMorris, F.A. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 10622-10628
74. Stumph, W.E., Baez, M., Beattie, W.G., Tsai, M.-J. and O'Malley, B.W. (1983) *Biochemistry* **22**, 306-315
75. Haynes, S.R. and Jelinek, W.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 6130-6134
76. Stumph, W.E., Hogson, C.P., Tsai, M.-J. and O'Malley, B.W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 6667-6671
77. Mirkovitch, J., Mirault, M.-E. and Laemmli, U.K. (1984) *Cell* **39**, 223-232
78. Sanzo, M., Stevens, B., Tsai, M.-J. and O'Malley, B.W. (1984) *Biochemistry* **23**, 6491-6498
79. Broach, J.R., Strathern, J.M. and Hicks, J.B. (1979) *Gene* **8**, 121-133
80. Ito, H., Fukuda, J., Murata, K. and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriology* **153**, 163-168
81. Jung, A., Sippel, A.E., Grez, M. and Schütz, G. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 5759-5763
82. Birnstiel, M.L., Busslinger, M. and Strub, K. (1985) *Cell* **41**, 349-359
83. McLauchlan, J., Gaffney, D., Whitton, J.L. and Clements, J.B. (1985) *Nucl. Acids Res.* **13**, 1347- 1368
84. Heins, B. and Beato, M. (1981) *Mol. Cell. Endocrinol.* **21**, 139-150
85. Barsh, G.S., Roush, C.L. and Gelinas, R.E. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 14906-14913

86. Bellard, M., Dretzen, G., Bellard, F., Kaye, J.S.,
Pratt-Kaye, S. and Chambon, P. (1986) *EMBO J.* **5**, 567-574
87. Wu, C. and Gilbert, W. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
78, 1577-1580
88. Kaye, J.S., Bellard, M., Dretzen, G., Bellard, F. and
Chambon, P. (*EMBO J.* **3**, 1137-1144
89. Siebenlist, U., Henninghausen, L., Battey, J. and Leder, P.
(1984) *Cell* **37**, 381-391
90. Kaye, J.S., Pratt-Kaye, S., Bellard, M., Dretzen, G.,
Bellard, F. and Chambon, P. (1986) *EMBO J.* **5**, 277-285
91. Breindl, M., Harbers, K. and Jaenisch, R. (1984) *Cell* **38**,
9-16
92. Weischet, W.O., Glotov, B.O., Schnell, H. and Zachau, H.G.
(1982) *Nucl. Acids Res.* **10**, 3627-3645
93. Palmiter, R.D. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 6450-6461
94. Choder, M., Bratosin, S. and Aloni, Y. (1984) *EMBO J.* **3**,
2929-2936
95. Jakobovits, E.B., Bratosin, S. and Aloni, Y. (1980)
Nature **285**, 263-265
96. Saragosti, S., Moyne, G. and Yaniv, M. (1980) *Cell* **20**,
65-73
97. Igo-Kemenes, T., Hörz, W. and Zachau, H.G. (1982)
Ann. Rev. Biochemistry **51**, 89-121
98. Emerson, B.M. and Felsenfeld, G. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 95-99

99. Merlino, G.T., McKeon, C., de Crombrughe, B. and Pastan, I. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 10041-10048
100. Wu, C. (1984) *Nature* **309**, 229-234
101. Jantzen, K., Fritton, H.P. and Igo-Kemenes, T. (1986) *Nucl. Acids Res.* **14**, 6085-6099
102. Theisen, M., Stief, A. and Sippel, A.E. (1986) *EMBO J.* **5**, 719-724
103. Jongstra, J., Reudelhuber, T.L., Oudet, P., Benoist, C., Chae, C.-B., Jeltsch, J.-M., Mathis, D.J. and Chambon, P. (1984) *Nature* **307**, 708-714
104. Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R.J., Krauter, P., Westphal, H.M. and Beato, M. (1984) *Nature* **308**, 513-519
105. Renkawitz, R., Schütz, G., Ahe, D. von der and Beato, M. (1984) *Cell* **37**, 503-510
106. Becker, P., Gloss, B., Schmid, W., Strähle, U. and Schütz, G. (1986) *Nature* **324**, 683-688
107. Moore, D.D., Marks, A.R., Buckley, D.J., Kapler, G., Payvar, F. and Goodman, H.M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 699-702
108. Atchison, M.L. and Perry, R.P. (1986) *Cell* **46**, 253-262
109. Morse, R.H. and Cantor, C.R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 4653-4657
110. Robbins, P.A. and Botchan, M. (1986) In: *The Role of cis and trans Acting Elements in the Initiation of Eukaryotic Transcription*, Gluzman, Y. (ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, New York

111. Lu, R., Cheung, S. and Arndt, K. (1983) *J. Biomol. Struct. and Dynam.* **1**, 509-521
112. Jost, J.-P., Seldran, M. and Geiser, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 429-433
113. Smith, R.D., Yu, J., Annunziato, A. and Seale, R.L. (1984) *Biochemistry* **23**, 2970-2976
114. Weisbrod, S., Groudine, M. and Weintraub, H. (1980) *Cell* **19**, 289-301
115. Baer, B. and Rhodes, D. (1983) *Nature* **301**, 482-488
116. Tsanev, R. (1983) *Mol. Biol. Rep.* **9**, 9-17
117. Nicolas, R.H., Wright, C.A., Cockerill, P.N., Wyke, J.A. and Goodwin, G.H. (1983) *Nucl. Acids Res.* **11**, 753-772
118. Danos, O., Katinka, M. and Yaniv, M. (1982) *EMBO J.* **1**, 231-236
119. Suck, D. and Oefner, C. (1986) *Nature* **321**, 620-625
120. Woychik, R.P., Lyons, R.H., Post, L. and Rottmann, F.M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 3944-3948
121. Loening, U.E. (1969) *Biochem. J.* **113**, 131-138
122. Southern, E.M. (1975) *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517
123. Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977) *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251
124. Simsek, M., Ziegenmeyer, J., Heckman, J. and RajBhandary, U.L. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 1041-1045

125. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**, 5463-5467
126. Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980) Methods Enzymol. **65**, 499-560
127. Staden, R. (1980) Nucl. Acids Res. **8**, 3673-3694
128. Pech, M., Jaenichen, H.R., Pohlenz, H.D., Neumaier, P.S., Klobeck, H.-G. and Zachau, H.G. (1984) J. Mol. Biol. **176**, 189-204
129. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory
130. Steimetz, M., Zachau, H.G. and Mach, B. (1979) Nucl. Acids Res. **6**, 3213-3229

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Bp	Basenpaar
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAase I	Desoxyribonuklease I aus Rinderpankreas
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz
EGTA	3,6-Dioxaoctamethylendinitrilotetraessigsäure
HS	DNAase I-hypersensitive Stelle
Kb	Kilobasenpaar (1000 Bp)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PMSF	Phenylmethansulfonylflourid
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Internationale Einheit der Enzymaktivität
V	Volt

Lebenslauf

Name : Jantzen
Vorname : Klaus Dieter
Geburtsdatum : 15.04.1958
Geburtsort : Albstadt-Ebingen
Name des Vaters : Jantzen, Herbert; geb. 27.06.1919
Beruf: Wirker
Name der Mutter : Jantzen, Irene, geborene Galonska
geb. 08.05.1925
Familienstand : ledig
Staatsangehörigkeit : deutsch
Konfession : evangelisch
Schulbildung : Volksschule Tailfingen
1965-1968
Gymnasium Ebingen, Abitur:
1968-1977
Landwirtschaft-
liches Praktikum : Gutshof Sassen, Hermansdorf
01.07.1977-30.09.1977
Hochschulstudium : Eberhard-Karls-Universität Tübingen,
Studiengang: Diplom-Biologie
Beginn: 1977
Diplomvorprüfung: 1979
Diplomhauptprüfung: 1982
Diplomarbeit: 1982-1983
Institut für Biologie II der Universität,
Prof. Dr. V. Hemleben
Thema: "Untersuchungen zur Transkription der
Chalkonsynthase-mRNA während der Blüten-
entwicklung verschiedener Linien von
Matthiola incana R. Br.
Seit dem WS 1984/85: Studium der Tier-
medizin an der Universität München,
cand. med. vet.
Promotion : Seit 01.03.1984, Institut für Physiolo-
gische Chemie, Physikalische Biochemie
und Zellbiologie der Universität München,
unter der Anleitung von Priv. Doz.
Dr. T. Igo-Kemenes

